

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
—
PARIS
—

(11) N° de publication : **2 751 346**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **96 09077**

(51) Int Cl⁶ : **C 12 N 15/13. C 12 N 15/85. 5/10. C 07 K 16/40.**
A 01 K 67/027

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 19.07.96.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : *INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM
ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH —
FR.*

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 23.01.98 Bulletin 98/04.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(72) Inventeur(s) : VANHOVE BERNARD. POURCEL
CHRISTINE et SOUILLOU JEAN PAUL.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : GROSSET FOURNIER ET DEMACHY
SARL.

(54) **PROCEDE DE PREPARATION D'ORGANES DE MAMMIFERES NON HUMAINS TRANSGENIQUES EN VUE DE
LEUR TRANSPLANTATION CHEZ L'HOMME, ET SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA MISE EN
OEUVRE DE CE PROCEDE.**

(57) L'invention a pour objet l'utilisation de séquences nu-
cléotidiq[ue]ues codant pour des anticorps dirigés contre toute
molécule impliquée dans un phénomène de rejet de greffe
(encore désignés ci-après anticorps anti-molécules), pour
la préparation de cellules transgéniques, ou organes trans-
géniques, de mammifères non humains, au sein desquels
lesdites molécules forment en totalité ou en partie des
complexes immuns avec lesdits anticorps anti-molécules,
de telle sorte que l'activité desdites molécules dans les
phénomènes de rejet de greffe soit totalement ou partiel-
lement inhibée, lesdites cellules ou lesdits organes transgé-
niq[ue]ues de mammifères non humains étant destinés à être
greffés chez un patient.

FR 2 751 346 - A1



5

PROCEDE DE PREPARATION D'ORGANES DE MAMMIFERES NON HUMAINS TRANSGENIQUES EN VUE DE LEUR TRANSPLANTATION CHEZ L'HOMME, ET SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE

10 La présente invention a pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques pour la mise en oeuvre d'un procédé de préparation d'organes de mammifères non humains transgéniques susceptibles d'être greffés chez l'homme en réduisant sensiblement les risques de rejet de greffes.

15 La transplantation d'organes animaux chez l'homme, ou xénotransplantation, est une technique considérée actuellement comme une alternative possible, permettant de pallier le manque crucial de donneur en allogreffe. Des avancées spectaculaires dans ce domaine ont été réalisées depuis quelques années, et le porc comme animal donneur s'impose à la communauté scientifique et médicale. Les raisons de ce choix, par opposition au choix de primates comme donneurs d'organes sont multiples: le risque de transmission de virus pathogènes pour l'homme est bien moindre à partir du porc (Allan, 1996), l'élevage et le temps de reproduction des primates, à l'opposé du porc, rend leur utilisation difficile, et une barrière d'ordre éthique non négligeable existe pour l'utilisation de singes à des fins de médecine humaine. L'obstacle majeur à l'utilisation de greffons de porc chez l'homme est avant tout immunologique: 20 l'homme possède des anticorps naturels (appelés xénoanticorps naturels-XAN-) dirigés contre des molécules exprimées par les cellules porcines. Lorsqu'un organe de porc est greffé chez l'homme (et chez les primates supérieurs qui possèdent aussi ces anticorps), ces anticorps réagissent avec l'endothélium vasculaire entraînant un rejet suraigu de l'organe. Il s'agit en fait de la perte, 25 induite par les XAN et le complément, de l'intégrité de l'endothélium vasculaire entraînant un oedème, une infiltration cellulaire et une destruction de l'organe (Bach et al., 1995). Les antigènes porcins reconnus par les XAN ont été analysés: il s'agit majoritairement d'une structure glucidique constituée de galactose branché en configuration α 1,3 sur le N-acétyllactosamine (épitope α -galactosyl) présent sur les glycolipides et les glycoprotéines de membrane 30 (Sandrin et al., 1993).

35 Les travaux réalisés par l'équipe de D. White (Cambridge) ont permis de résoudre partiellement ce problème de rejet hyperaigu: en bloquant l'activation

du complément humain à la surface des cellules de l'endothélium porcin (Carrington et al, 1995), ils sont parvenus à réaliser des greffes de coeur de porc chez le macaque, dont la survie semble similaire à la survie d'une allogreffe (greffe d'un organe de la même espèce) réalisée dans les mêmes conditions, dans la mesure où le dépôt de XAN n'est pas trop massif. Techniquement, cela a été réalisé par insertion, par transgenèse germinale, d'une molécule régulatrice du complément humain, le DAF (pour decay accelerating factor, ou CD55), dans le génome de porc. Cette molécule, spécifique d'espèce, empêche la C3 convertase humaine d'enclencher la réaction en chaîne d'activation du complément à la surface des cellules porcines. Cette molécule semble toutefois "dépassée" lorsque la quantité de complément fixée est trop importante. Dans ce cas, un rejet survient quand même.

La présence des épitopes α -galactosyl, le xénoantigène majeur sur les cellules porcines, est due à l'action d'une enzyme golgienne, UDP-Gal:Gal α 1-4GlcNac α 1,3-galactosyltransférase (encore désignée enzyme α 1,3GT). L'enzyme α 1,3GT participe à la fixation de galactose, en configuration α 1,3, sur le galactose du N-acétyllactosamine des glycoprotéines et glycolipides membranaires, ce qui crée un épitope xénoantigénique appelé α -galactosyl constitué de l'ensemble Gal α 1,3Gal-N-acétyllactosamine. L'inactivation du gène codant pour cette enzyme chez le porc pourrait bloquer la synthèse des épitopes α -galactosyl et induirait la non reconnaissance des cellules de porc par les XAN humains. Cette inactivation, utilisée conjointement à l'expression de DAF humain chez le porc, pourrait représenter un bénéfice décisif pour la réussite de la xénogreffe d'organes de porc chez l'homme. Cependant, l'inactivation d'un gène par recombinaison homologue ("gene knock out") est une technique dont l'utilisation est actuellement restreinte à la souris, car sa mise en oeuvre nécessite la disponibilité de cellules souches embryonnaires, dites cellules ES. Ces cellules, malgré d'intenses recherches, n'ont jamais pu être obtenues chez une autre espèce que la souris. L'inactivation de l' α 1,3GT chez le porc ne peut donc pas être réalisée par cette technique.

A part les molécules xénoantigéniques et les molécules participant à la biosynthèse de ces dernières, il existe d'autres molécules dont l'inhibition pourrait être utile en xénotransplantation, en particulier les molécules dont l'activité biologique concourt au rejet de greffe, sans que ces molécules ne soient des xénoantigènes ou ne participent à la synthèse de xénoantigènes. Il s'agit notamment de l'ensemble des molécules à caractère inflammatoire produites par l'endothélium du greffon, en particulier lors d'une xénogreffe : cytokines (IL-1, IL-6), facteurs chémotactiques (IL-8, IP-10, RANTES,

MCP/JE, inhibiteurs p15E, GFM-CSF, G-CSF), molécules d'adhésion (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, c-sis, GPIb α , vWF, ligand LAM-1), facteurs de transcription (c-fos, NFkB, Gem), régulateurs du tonus vasculaire (iNO synthase, PGH synthase, endothéline), facteurs intervenant dans la coagulation (PAF acétyltransférase, facteur tissulaire, PAI-1), facteurs d'immunocompétence (CMH I, CMH II). Il s'agit aussi des récepteurs, exprimés par l'endothélium du greffon, à des molécules provenant du receveur et ayant une activité biologique concourant au rejet de greffe : récepteur au C5a, récepteur au TNF α , récepteur à l'INF γ , récepteurs aux cellules NK.

La présente invention a pour but de fournir des organes de mammifères non humains transgéniques susceptibles d'être greffés chez des patients nécessitant une greffe d'organes, avec diminution du risque de phénomène de rejet du greffon, voire complète annulation de ce risque.

La présente invention a également pour but de fournir des séquences nucléotidiques susceptibles d'être utilisées pour la transformation génétique d'animaux en vue d'obtenir les susdits organes.

L'invention a également pour but de fournir des mammifères non humains transgéniques à partir desquels sont susceptibles d'être prélevés les susdits organes.

La présente invention a pour objet l'utilisation de séquences nucléotidiques codant pour des anticorps dirigés contre toute molécule impliquée dans un phénomène de rejet de greffe (encore désignés ci-après anticorps anti-molécules), et notamment contre toute molécule possédant une activité telle que ladite molécule représente un épitope xénoantigénique, ou participe à la biosynthèse d'épitopes xénoantigéniques dans des cellules de mammifères non humains (et plus particulièrement à la surface de ces cellules), ces épitopes étant susceptibles d'être reconnus par des xénoanticorps naturels humains lorsque lesdites cellules, ou organes constitués de ces cellules, de mammifères non humains, sont greffés chez l'homme, pour la préparation de cellules transgéniques, ou organes transgéniques, de mammifères non humains, au sein desquels lesdites molécules forment en totalité ou en partie des complexes immuns avec lesdits anticorps anti-molécules, de telle sorte que l'activité desdites molécules dans les phénomènes de rejet de greffe soit totalement ou partiellement inhibée, en particulier que les xénoanticorps susmentionnés ne reconnaissent plus, en totalité ou en partie, les susdits épitopes, ou au sein desquels la biosynthèse desdits épitopes xénoantigéniques est partiellement ou totalement inhibée, lesdites cellules ou lesdits organes transgéniques de mammifères non humains étant destinés à être greffés chez un patient.

Les séquences nucléotidiques utilisées dans le cadre de la présente invention sont avantageusement celles codant pour des anticorps dirigés contre :

- tout épitope xénoantigénique, glucidique ou non glucidique, reconnu par des xénoanticorps humains, et plus particulièrement les épitopes glucidiques galactosylés situés à la surface des membranes de cellules de mammifères non humains, notamment l'épitope α -galactosyl présent à la surface de cellules de porc et constitué de l'ensemble Gal α 1,3Gal-N-acétyllactosamine susmentionné,

10 - toute molécule participant à la biosynthèse d'épitopes xénoantigéniques chez l'homme, de nature glucidique ou non glucidique, et plus particulièrement les galactosyltransférases présentes dans les cellules de mammifères non humains, notamment l'enzyme α 1,3GT présente dans les cellules de porc,

15 - toute molécule à caractère inflammatoire synthétisée dans l'endothélium de mammifères non humains, et dont l'activité biologique conduit notamment à la modification des propriétés anticoagulantes de l'endothélium *in vivo* en milieu xénogénique, telle que les cytokines et chemoattracteurs (IL-1, IL-6, IL-8, IP-10, RANTES, MCP/JE, inhibiteurs p15E, GM-CSF, G-CSF), les molécules d'adhésion (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, c-sis, GPIb α , vWF, ligand LAM-1) les facteurs de transcription ou modifiant la transcription (c-fos, NFkB, Gem), les régulateurs du tonus vasculaire (iNO synthase, PGH synthase, endothéline), les facteurs intervenant dans la coagulation (PAF acétyltransférase, facteur tissulaire, PAI-1), les facteurs d'immunocompétence (CMH I, CMH II),

20

- les récepteurs membranaires à des molécules présentes chez le receveur, l'action de ces molécules étant dirigée vers un rejet de greffe, dont par exemple le C5aR, ou le TNF α R, ou les récepteurs aux cellules NK.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de molécules impliquées dans un phénomène de rejet de greffe, telles que décrites ci-dessus, pour la mise en oeuvre d'un procédé d'obtention, notamment selon les méthodes décrites ci-dessous, de séquences nucléotidiques codant pour des anticorps dirigés contre les susdites molécules, ces séquences nucléotidiques étant elles-mêmes susceptibles d'être utilisées pour la préparation de cellules transgéniques, ou d'organes transgéniques tels que définis ci-dessus selon l'invention.

30

35 Avantageusement, les séquences nucléotidiques utilisées dans le cadre de l'invention sont obtenues par sélection des susdits anticorps anti-molécules à savoir des anticorps dirigés contre les molécules impliquées dans un phénomène de rejet de greffe, cette sélection étant effectuée à l'aide desdites molécules utilisées en tant que molécules cibles reconnues par lesdits anticorps, et séquençage des séquences nucléotidiques codant pour lesdits anticorps ainsi sélectionnés.

Lesdits anticorps anti-molécules sont eux-mêmes avantageusement obtenus à partir de tout hybridome susceptible d'être formé, par des méthodes classiques, à partir de cellules spléniques d'un animal, notamment de souris ou de rat, immunisés contre l'une desdites molécules impliquées dans un phénomène de rejet de greffe, d'une part, et des cellules d'un myélome approprié d'autre part, ledit hybridome étant sélectionné par sa capacité à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant ladite molécule initialement mise en oeuvre pour l'immunisation des animaux.

L'ADN des hybridomes ainsi sélectionné est ensuite cloné, selon les techniques bien connues de l'homme de métier, dans des hôtes cellulaires susceptibles de produire lesdits anticorps monoclonaux, les séquences nucléotidiques codant pour lesdits anticorps ainsi sélectionnés, étant ensuite séquencées.

Lesdits anticorps anti-molécules peuvent également être obtenus par criblage d'une banque d'anticorps (telle que la banque décrite dans l'article de Nissim et al., 1994) avec lesdites molécules, ladite banque d'anticorps étant construite à partir de séquences d'ADN d'immunoglobulines humaines ou murines, ou issues d'une autre espèce, dans un hôte cellulaire (notamment dans des phages) susceptibles d'exprimer les anticorps codés par lesdites séquences d'ADN d'immunoglobulines.

Avantageusement, les anticorps susmentionnés, à partir desquels sont déduites les séquences nucléotidiques utilisées dans le cadre de la présente invention sont des anticorps simple brin (encore désignés anticorps ScFv).

Ces anticorps ScFv sont avantageusement obtenus à partir d'une banque d'anticorps telle que décrite ci-dessus, dans laquelle les séquences d'ADN codant pour ces anticorps sont traitées, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Nissim et al., 1994, de manière à obtenir des anticorps simple brin, notamment par jonction de tout ou partie d'une séquence d'ADN codant pour une chaîne lourde d'immunoglobuline avec tout ou partie d'une séquence d'ADN codant pour une chaîne légère d'immunoglobuline.

Ces anticorps ScFv peuvent également être obtenus par clonage de l'ADN complémentaire (ADNc) issu d'hybridomes, tels que décrits ci-dessus, codant pour une immunoglobuline dirigée contre une desdites molécules impliquées dans un phénomène de rejet de greffe, suivi d'un traitement, tel que décrit ci-dessus, de manière à obtenir des anticorps simple brin par jonction de tout ou partie de la fraction dudit ADNc codant pour la chaîne lourde de l'immunoglobuline avec tout ou partie de la fraction dudit ADNc codant pour la chaîne légère de cette immunoglobuline.

5 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, les séquences nucléotidiques utilisées pour la préparation de cellules ou organes transgéniques susmentionnés, sont celles codant pour des anticorps dirigés contre toute molécule impliquée dans la biosynthèse d'épitopes xénoantigéniques dans les cellules de mammifères non humains.

10 Avantageusement, les séquences nucléotidiques utilisées dans le cadre de la présente invention sont celles codant pour des anticorps dirigés contre l'une au moins des isoformes (et avantageusement contre toutes les isoformes) des galactosyltransférases présentes chez les mammifères non humains, et plus particulièrement contre l'une au moins des isoformes de l' α 1,3GT présente chez le porc, pour la préparation d'organes de mammifères non humains transgéniques au sein desquels la biosynthèse des épitopes α -galactosyl dans les cellules desdits organes est partiellement ou totalement inhibée.

15 A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les anticorps, le cas échéant simple brin, dirigés contre l'une au moins des isoformes de l' α 1,3GT lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par mise en oeuvre d'une des méthodes décrites ci-dessus effectuées à l'aide d'une ou plusieurs isoformes de l' α 1,3GT, en tant que molécules impliquées dans un phénomène de rejet de greffe.

20 L'invention concerne plus particulièrement les anticorps tels que décrits ci-dessus, dirigés contre l'une au moins des isoformes de l' α 1,3GT présentes chez le porc, et notamment contre l'une au moins des isoformes représentées par les séquences en acides aminés SEQ ID NO 2 (correspondant à l'isoforme 1), SEQ ID NO 4 (correspondant à l'isoforme 2), SEQ ID NO 6 (correspondant à l'isoforme 3) et SEQ ID NO 8 (correspondant à l'isoforme 4), ces isoformes 1 à 4 étant respectivement codées par les séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 7, ou codées par toutes séquences nucléotidiques dérivées de ces dernières, notamment par dégénérescence du code génétique.

25 30 L'invention vise plus particulièrement les anticorps tels que décrits ci-dessus, dirigés contre l'une au moins des isoformes 3 et 4 de l' α 1,3GT présentes chez le porc et représentées par les séquences en acides aminés SEQ ID NO 6 et SEQ ID NO 8.

35 Avantageusement les anticorps anti- α 1,3GT susmentionnés de l'invention sont des anticorps simple brin dont les séquences en acides aminés sont telles qu'elles contiennent les parties CDR1, CDR2 et CDR3 de la chaîne lourde desdits anticorps anti- α 1,3GT reliés par une séquence liante (linker) d'environ

6 à environ 36 acides aminés, à tout ou partie de la chaîne légère V λ 3 des anticorps anti- α 1,3GT susmentionnés.

Un linker particulièrement préféré est celui constitué de trois répétitions successives de la séquence en acides suivante :

Gly - Gly- Gly- Gly- Ser

Des anticorps particuliers selon l'invention sont ceux représentés par les séquences en acides aminés SEQ ID NO 10 (anticorps désigné ScFv1), SEQ ID NO 12 (anticorps désigné ScFv2), SEQ ID NO 14 (anticorps désigné ScFv3), SEQ ID NO 16 (anticorps désigné ScFv4) et SEQ ID NO 18 (anticorps désigné ScFv5), ou par toute séquence en acides aminés dérivée de ces dernières, notamment par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou par tout fragment des séquences susmentionnées ou de leurs séquences dérivées, lesdites séquences dérivées et lesdits fragments étant susceptibles de reconnaître l'une au moins des isoformes de l' α 1,3GT.

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour un anticorps anti- α 1,3GT tel que décrit ci-dessus, et comportant notamment les séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 9 (codant pour ScFv1), SEQ ID NO 11 (codant pour ScFv2), SEQ ID NO 13 (codant pour ScFv3), SEQ ID NO 15 (codant pour ScFv4), SEQ ID NO 17 (codant pour ScFv5), ou toute séquence nucléotidique dérivée de ces dernières, notamment les séquences dérivées par dégénérescence du code génétique, et étant néanmoins capables de coder pour les anticorps ScFv1, ScFv2, ScFv3, ScFv4 ou ScFv5, ou les séquences dérivées par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, ou tout fragment des séquences nucléotidiques susmentionnées ou de leurs séquences dérivées, lesdites séquences dérivées et lesdits fragments étant susceptibles de coder pour un anticorps susceptible de reconnaître l'une au moins des isoformes de l' α 1,3GT.

Les séquences nucléotidiques SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 et SEQ ID NO 17 susmentionnées sont avantageusement obtenues par séquençage des ADNc codant pour les anticorps représentés par SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 16 et SEQ ID NO 18 respectivement, ces ADNc provenant de clones cellulaires sélectionnés pour leur capacité à produire lesdits anticorps, la sélection desdits clones cellulaires étant effectuée à l'aide de l'isoforme 2 de l' α 1,3 GT (à savoir du polypeptide représenté par SEQ ID NO 4) utilisée en tant que molécule cible reconnue par lesdits anticorps, lesdits clones cellulaires, étant eux-mêmes obtenus par transformation de cellules, notamment de bactéries ou de phages, avec des séquences nucléotidiques provenant d'une banque d'ADNc codant pour

des anticorps, telle que la banque susmentionnée décrite par Nissim et al., 1994, ou provenant d'hybridomes obtenus selon la technique indiquée ci-dessus par immunisation d'un animal avec ladite isoforme n° 2 de l'α1,3GT.

L'invention a également pour objet tout vecteur, notamment plasmide, contenant l'une au moins des séquences nucléotidiques décrites ci-dessus selon l'invention, notamment l'une au moins des séquences SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 ou SEQ ID NO 17, et les éléments nécessaires à l'expression des anticorps anti-molécules, et plus particulièrement des anticorps anti-α1,3GT susmentionnés.

L'invention concerne également tout hôte cellulaire (telle qu'une cellule eucaryote) contenant l'un au moins des vecteurs tels que décrits ci-dessus, selon l'invention.

L'invention concerne également tout mammifère transgénique non humain, ou toute cellule de mammifère transgénique non humain, comprenant dans leur génome au moins une séquence nucléotidique décrite ci-dessus, codant pour des anticorps anti-molécules tels que décrits ci-dessus, et plus particulièrement pour des anticorps anti-α1,3GT susmentionnés.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout mammifère transgénique non humain, ou toute cellule de mammifère transgénique non humain, tels que décrits ci-dessus, comprenant dans leur génome au moins une des séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 et SEQ ID NO 17, ou au moins une séquence dérivée ou fragment tels que définis ci-dessus, desdites séquences nucléotidiques.

Avantageusement, les mammifères transgéniques non humains, selon l'invention sont tels qu'obtenus par introduction, notamment par microinjection, dans un ovocyte fécondé, d'au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, codant pour un anticorps anti-molécules tel que défini ci-dessus, et plus particulièrement d'au moins une des séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ NO 15 et SEQ ID NO 17, ou leur séquence dérivée ou fragment tels que définis ci-dessus, et insertion de l'embryon dans la matrice d'une mère de substitution et développement de l'embryon à terme.

L'invention a également pour objet tout mammifère transgénique non humain défini ci-dessus, tel que produit par croisement d'animaux transgéniques exprimant au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, codant pour un anticorps anti-molécules, et plus particulièrement au moins une des séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11,

SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 et SEQ ID NO 17, ou leur séquence dérivée ou fragment tels que définis ci-dessus.

A titre d'illustration, les mammifères transgéniques non humains, selon l'invention, peuvent être obtenus selon la méthode décrite dans l'article de DePamphilis M.L., et al., 1988.

5 Parmi les mammifères transgéniques non humains susceptibles d'être obtenus dans le cadre de la présente invention, on peut citer la souris, le rat, le porc ou le lapin.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet les porcs transgéniques contenant dans leur génome au moins une des séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 et SEQ ID NO 17, ou leur séquence dérivée ou fragment tels que définis ci-dessus.

15 L'invention concerne également les cellules cultivées à partir des animaux transgéniques non humains tels que décrits ci-dessus.

20 L'invention a également pour objet les organes de mammifères non humains, et plus particulièrement les organes de porc, notamment les reins, le foie, le pancréas ou le cœur, comprenant dans le génome des cellules les constituant au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, codant pour un anticorps anti-molécules, et plus particulièrement d'au moins une des séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 15 et SEQ ID NO 17, ou leur séquence dérivée ou fragment tels que définis ci-dessus, lesdits organes étant tels qu'obtenus par prélèvement sur des mammifères transgéniques non humains selon l'invention.

25 L'invention concerne également tout polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés telle que représentée par SEQ ID NO 6 (correspondant à l'isoforme 3 de l' α 1,3GT) ou SEQ ID NO 8 (correspondant à l'isoforme 4 de l' α 1,3GT), ou tout polypeptide contenant tout fragment d'au moins environ 6 acides aminés, de l'une des susdites séquences d'acides aminés, ledit polypeptide contenant ce fragment étant susceptible de générer des anticorps reconnaissant l'une au moins des quatre isoformes de l' α 1,3GT, ou comprenant toute séquence dérivée de ces dernières, notamment par addition, suppression ou modification d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que la séquence dérivée soit susceptible de générer des anticorps reconnaissant l'une au moins des quatre susdites isoformes.

30 35 L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques comprenant les séquences représentées par SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 7, ou toutes séquences dérivées, notamment les séquences dérivées par dégénérescence

du code génétique, et étant néanmoins capables de coder pour les polypeptides représentés par les séquences en acides aminés représentées par SEQ ID NO 6 et SEQ ID NO 8 respectivement, ou les séquences dérivées par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, ou tout fragment des 5 séquences nucléotidiques susmentionnées ou de leur séquences dérivées, lesdites séquences dérivées et lesdits fragments étant susceptibles de coder pour un anticorps susceptible de reconnaître l'une au moins des isoformes de l' α 1,3GT.

L'invention concerne également tout vecteur, notamment plasmide, comprenant au moins une séquence nucléotidique codant pour les séquences 10 représentées par SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6, ou par une séquence dérivée ou fragment de ces dernières, tels que définis ci-dessus, ainsi que les éléments nécessaires à l'expression des isoformes de l' α 1,3GT codées par lesdites séquences nucléotidiques.

L'invention vise également tout hôte cellulaire transformé par un vecteur 15 tel que décrit ci-dessus, ainsi que tout procédé de préparation des isoformes 3 et 4 susmentionnées de l' α 1,3GT par mise en culture dudit hôte cellulaire dans un milieu de culture approprié, et séparation desdites isoformes des autres constituants du milieu de culture.

L'invention a plus particulièrement pour objet toutes séquences 20 nucléotidiques avantageusement obtenues par séquençage des ADNc codant pour les anticorps dirigés contre les isoformes 3 et 4 susmentionnées de l' α 1,3GT, ces ADNc provenant de clones cellulaires sélectionnés pour leur capacité à produire lesdits anticorps, la sélection desdits clones cellulaires étant effectuée à l'aide de l'isoforme 3 et/ou 4 de l' α 1,3 GT (à savoir des polypeptides 25 représentés par SEQ ID NO 6 et SEQ ID NO 8, respectivement) utilisées en tant que molécules cibles reconnues par lesdits anticorps, lesdits clones cellulaires, étant eux-mêmes obtenus par transformation de cellules, notamment de bactéries ou de phages, avec des séquences nucléotidiques provenant d'une banque 30 d'ADNc codant pour des anticorps, telle que la banque susmentionnée décrite par Nissim et al., 1994, ou provenant d'hybridomes obtenus selon la technique indiquée ci-dessus par immunisation d'un animal avec ladite isoforme 3 ou ladite isoforme 4 de l' α 1,3GT.

L'invention a également pour objet toute méthode, notamment chirurgicale, de traitement de patients nécessitant une greffe de cellules ou 35 d'organes, par implantation desdites cellules transgéniques selon l'invention dans des tissus appropriés dudit patient, ou par suppression de l'organe défectueux du patient et remplacement de cet organe défectueux par un organe de mammifère non humain transgénique selon l'invention.

5 L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'obtention des différentes isoformes de l' α 1,3GT de porc, ainsi que de la transformation de cellules animales à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des anticorps anti- α 1,3GT selon l'invention, et de procédures d'obtention d'animaux transgéniques selon l'invention.

10 I - Obtention des différents isoformes de l' α 1,3 GT

15 1) Procédures expérimentales

20 a) Cellules et tissus

25 Les organes porcins ont été obtenus à partir de porcs d'environ 200 à 300 kg. L'isolement enzymatique et la culture des cellules endothéliales aortiques de porc (PAEC) ont été réalisés selon la méthode décrite dans l'article de Warren, 1990. Les PAEC sont stimulées avec 100 U/ml de TNF α humain (Genzyme, Cambridge, USA) en présence ou non de 10 μ g/ml de cycloheximide.

30 b) Oligonucléotides

20 Les oligonucléotides suivants ont été utilisés :

25 - oligonucléotide 1

30 5'-AGGAAGAGTGGTTCTGTC-3' hybridant aux nucléotides 24 à 41 de la séquence SEQ ID NO 1,

35 -oligonucléotide 2

40 5'-GTTATGGTCACGACCTCT-3' hybridant aux nucléotides 323 à 306 de la séquence SEQ ID NO 1,

45 -oligonucléotide 3

50 5'-TATAGAATTTCGAAAATAATGAATGTCAAAGGAATAGTGGTTCTGTC-3' hybridant à un site EcoRI situé en amont des nucléotides 1 à 41 de la séquence SEQ ID NO 1,

55 - oligonucléotide 4

5'-ATATAACTAGTGGAAAGCTCTCCTCTGTTG-3' hybridant aux nucléotides 278 à 255 de la séquence SEQ ID NO 1, et introduisant une mutation de G en A dans la troisième base du codon codant pour une proline,

60 - oligonucléotide 5

65 5'-ATATACTAGTGGACTGGTTAAC-3' hybridant aux nucléotides 275 à 292 de la séquence SEQ ID NO 1, et introduisant la même mutation de G₂₆₁ en A comme dans le cas de l'oligonucléotide 4,

- oligonucléotide 6

5' -GAGTCACTTGTCATCGTCGTCCTTGTAAATCGATGTTATTTCTAACCA
AATT-3' hybridant aux nucléotides 1105 à 1123 de la séquence SEQ ID NO 1,
et additionné en phase à un oligonucléotide codant pour un peptide FLAG
(Kodak, New Haven, USA) un codon stop et un site Xhol.

c) clonage et construction

10 Un clone d'ADNc α 1,3GT de 2 Kb (pCDNA- α GT) a été isolé d'une banque d'ADNc construite dans le vecteur pCDNA-1 (Invitrogen, Leek, Pays-Bas) par hybridation de transfert en utilisant une sonde PCR amplifiée avec les amorces 1 et 2 (dérivées de la séquence publiée dans l'article de Sandrin et al., 1994). Ce clone correspond à celui de l'isoforme n° 2.

15 Les isoformes 1, 3 et 4 de l' α 1,3GT porcine ont été isolées par amplification par PCR d'une région comprenant les exons 4 à 7 avec les amorces 1 et 2, en utilisant l'ARN rétro-transcrit des PAEC. Les fragments amplifiés sont traités par la polymérase de Klenow, pour obtenir des extrémités franches, et clonés dans le site SmaI du plasmide pUC18. Trois clones contenant des fragments de 300, 237 et 201 pb ont été obtenus et utilisés en tant que matrice pour introduire, par amplification PCR secondaire, un site EcoRI à l'extrémité 5' (avec l'oligo 3) et un site SpeI dans l'exon 7 (avec l'oligo 4). L'introduction de ce site SpeI ne modifie pas la séquence en acides aminés. Les produits de PCR ont été ligués dans un plasmide pKS digéré par EcoRI-SpeI. La partie 3' restante de la séquence codante a été amplifiée par PCR à partir du clone pCDNA- α GT avec les amorces 5 et 6, traitée pour obtenir des extrémités franches et clonée dans le site EcoRV d'un plasmide pKS. A partir de ce plasmide recombinant, un fragment SpeI portant la région codante du nucléotide 262 à 1125, en phase avec une séquence FLAG (contenue dans l'oligonucléotide 6), a été isolée et clonée dans les sites SpeI des plasmides pKS contenant les régions 5' variables. Les construits résultant ont été contrôlés par séquençage, et les fragments EcoRI, contenant les séquences codantes entières ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression encaryotique pCDAAS-néo conduisant l'expression du transgène sous contrôle du promoteur du CMV. L'isoforme 2 de l' α GT porcine a été isolée de la même manière, en utilisant le clone pCDNA- α GT comme matrice initiale.

d) transfection de cellules

Des cellules HeLa cultivées en RPMI - 10 % FCS ont été traitées par la trypsine, resuspendues à raison de 5.10^6 cellules/ml dans un milieu glacé et mélangées avec 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN plasmidique portant le transgène et un gène de résistance à la néomycine. Les cellules ont été traitées par électroporation à 250 V, 350 μF , laissées dans la glace pendant 10 mn et ensemencées à raison de 2000 cellules/cm². Après 24 h, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 ont été additionnés et les cellules ont été cultivées pendant deux semaines. Les clones ont été isolés et cultivés en présence de G418.

10

e) immunofluorescence

Les clones de cellules HeLa exprimant une des quatre isoformes de l' α 1,3GT ont été ensemencées sur des lamelles à 4 chambres pour microscope (Nunc, Rookilde, Danemark), pour l'analyse de l'expression des épitopes α -galactosyl sur les membranes cellulaires. Deux jours après l'ensemencement, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS, fixées pendant 10 mn à température ambiante avec du paraformaldéhyde 3 %, lavées encore et incubées pendant une heure à température ambiante avec l'isolectine B4 - FITC de *Banderaea simplicifolia* (Sigma, St Louis, USA), dilution au 1.100 dans du PBS. Les lamelles ont été lavées 4 fois dans du PBS avant montage. Pour la localisation subcellulaire, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 3 % et perméabilisées par trois incubations séquentielles de 5 mn avec 50 %, 100 % et 50 % d'acétone glacée. Après trois lavages avec du PBS/Tween-20 0,5 %, les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-FLAG M2 (1:200 ; Kodak, New Haven, USA), puis incubées pendant une heure avec un anticorps secondaire d'âne anti-souris marqué au FITC (1 : 500 ; Jackson, Baltimore, USA). Les préparations ont été montées dans un fluide FA (Difco, Grayson, USA) et visualisées avec un microscope à épifluorescence Nikon.

20

f) Analyses par transfert d'ADN (Northern blot)

L'ARN cellulaire total a été isolé à partir de cellules cultivées et d'organes décrits par Zipfel et al..., 1989. Dix μg d'ARN total ont été fractionnés sur un gel d'agarose/formaldéhyde, transférés sur une membrane Hybond N (Amersham, Little Chalfont, UK) par action capillaire dans 20 X SSC pendant 16 h et immobilisés par réticulation aux UV. Les filtres ont été pré-hybridés pendant 6 h dans une solution contenant 50 % de formamide, 5 X SSPE (0,18 M NaCl, 10 mM phosphate de sodium, pH7,7, 1 mM EDTA), 5 X Denhart's, 0,5 % SDS, et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'ADN dénaturé de sperme de saumon. L'ARN lié

25

30

35

aux membranes a été hybridé avec des sondes d'ADNc marquées au P^{32} correspondant à la région codante de l'isoforme 1 de l' α 1,3 GT, à la β -actine porcine ou à l'ARN 28S. L'hybridation a été réalisée pendant une nuit à 42°C dans une solution de pré-hybridation contenant 10^6 cpm/ml d'une sonde. Les filtres ont été lavés deux fois dans 2 X SSPE, 0,5 % de SDS à température ambiante pendant 15 mn, et trois fois dans 0,5 X SSPE, 0,5 % SDS à 65 °C pendant 15 mn. L'hybridation a été visualisée et les signaux quantifiés avec un dispositif phosphorimage (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA).

10 g) test de protection à la RNase

Les tests de protection à la RNase ont été réalisés selon la méthode décrite par Melton et al., 1984. Deux sondes d'ARN, complémentaires des exons 5 et 6, et des exons 4 et 7, ont été préparées de la manière suivante : deux fragments EcoRI-SpeI, correspondant aux nucléotides 7 à 266 du clone α G Tiso 1, et aux nucléotides - 7 à 174 du clone α GT iso4 (Fig. 1) ont été sous-clonés dans les sites EcoRI-SpeI des plasmides pKS. En utilisant l'ARN polymérase T7, les sondes d'ARN antisens ont été synthétisées et du ^{32}P dUTP a été incorporé. L'ADN plasmidique matrice a été digéré avec l'ADNase I, et 500 000 cpm de chaque sonde ont été hybridés pendant 16 h à 10 μ g d'ARN total d'organes porcins ou de cellules dans 30 μ l de tampon d'hybridation contenant 80 % de formamide, à 50 °C. Les échantillons de contrôle contiennent 10 μ g d'ARN de levure. Les mélanges d'hybridation ont été dilués à 400 μ l avant l'addition de 5 μ g/ml de RNase A et 10 U/ml de RNase T1. Après 1 h à 30 °C, 50 %g de protéinase K et de SDS à 0,5 % ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été extrait au phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol. Les produits de digestion ont été analysés sur des gels de polyacrylamide à 6 %. Les gels ont été exposés pendant 16 h contre des films Kodak AR à - 80°C.

30 2) Résultats

a) Clonage de quatre isoformes de l' α 1,3GT

Comme décrit précédemment, une banque d'expression d'ADNc porcin construite en utilisant l'ARN LLC-PK1 (Guerif et al, 1995), a été criblée en utilisant une sonde correspondant à l'extrémité 5' de la séquence codante. Un clone d'ADNc, pcDNA- α GT, avec la région codante correspondant à une α 1,3GT porcine déjà décrite (Sandrin et al, 1994), a été isolé. Cette α 1,3 GT correspond à l'isoforme 2 représentée par SEQ ID NO 4 et codée par la séquence SEQ ID NO 3. Ce clone pcDNA- α GT contient une région 3' non

traduite longue de 770 pb, une région codante de 1080 pb contenant les homologues porcins de ce qui a été défini dans le cas de la souris comme étant les exons.. 4, et 6 à 9 (Joziasse et al., 1992) et une région 5' non traduite de 150 pb. En utilisant des amores adjacentes aux exons. 4 et 7, l'amplification PCR de l'ADN des PAEC a été réalisée. Des produits d'amplification d'environ 200 pb à 300 pb ont été trouvés, suggérant l'existence de transcrits supplémentaires. Trois produits différents ont été clonés, l'un deux étant identique à la séquence décrite par Strahan et al, 1995 (et désignée ici comme étant l'isoforme 1, Fig. 1, à savoir l'isoforme représentée par SEQ ID NO 2 codée par la séquence SEQ ID NO 1). En comparaison avec l'isoforme 2 susmentionnée (provenant du clone pcDNA- α GT), il contient un segment supplémentaire de 36 pb après le nucléotide 80. Un autre produit, l'isoforme 3, à savoir l'isoforme représentée par SEQ ID NO6 codée par la séquence SEQ ID NO5, ne comporte pas un segment de 63 pb du nucléotide 117 au nucléotide 179, et le dernier produit, l'isoforme 4, à savoir l'isoforme représentée par SEQ ID NO 8, et codée par la séquence SEQ ID NO7, ne comporte pas le segment de 36 pb du nucléotide 81 au nucléotide 116, et le segment de 63 pb du nucléotide 117 au nucléotide 179 (Fig. 1). La traduction des ARNm correspondant à chacun des transcripts identifiés, prédit la synthèse de quatre formes du polypeptide α 1,3GT, de 372, 360, 351 et 339 acides aminés qui diffèrent seulement dans la longueur de leurs régions "stem" (tiges) respectives. La situation décrite ici est comparable à celle décrite dans le cas de la souris (Joziasse et al., 1992), puisque quatre ARNm différents ont été trouvés, contenant les exons 5 et 6, ou contenant seulement l'exon 5 ou l'exon 6, ou ne contenant ni l'exon 5 ni l'exon 6. Les segments porcins de 36 pb et 63 pb correspondent bien aux exons 5 et 6 murins, à l'exception du fait que, dans la souris, l'exon 6 est long de 66 pb au lieu de 63 pb chez le porc (Fig. 1).

b) Activité α 1,3GT des isoformes

La présence ou l'absence des exons 5 et 6 détermine quatre variations de longueur dans la région stem de l' α 1,3GT. Cette région, localisée à l'intérieur de l'appareil de Golgi, lie le signal d'ancrage transmembranaire au domaine luminal catalytiquement actif. Afin de vérifier si les quatre isoformes définies par l'épissage alternatif des exons 5 et 6 sont catalytiquement actifs, des cellules HeLa humaines ont été transformées avec des plasmides recombinants exprimant chacune des quatre isoformes de l' α 1,3GT porcine sous le contrôle du promoteur CMV. Le produit de cette enzyme sur les surfaces des cellules a été analysé par immunofluorescence, en utilisant la lectine IB-4 réagissant

spécifiquement avec les résidus Gal α . L'épitope Gal α pouvait être détecté à la surface des cellules HeLa traduites avec les quatre isoformes de l'enzyme, comme le montre la liaison à la lectine IB-4 (Fig. 2), indiquant que ces isoenzymes possèdent toutes une activité α -galactosyltransférase. Les niveaux d'expression des ARNm de l' α 1,3GT dans les clones HeLa- α 1,3GT de porc, ont été contrôlés par Northern blot, et sont légèrement supérieurs dans les clones contenant les isoformes 1 et 2, et légèrement inférieurs pour le clone contenant les isoformes 2 et 3, par rapport au niveau trouvé dans les PAEC.

10 c) Localisation subcellulaire des isoformes α 1,3GT

La localisation Golgienne de l' α 1,3GT est due à la présence dans l'exon 4 d'un domaine signal d'ancre. Les variations de longueur dans la région stem, c'est-à-dire la présence ou l'absence des exons 5 et 6, peuvent également influencer la rétention dans le Golgi (Dahdal et al., 1993) ou exposer un site de clivage sensible aux protéases sur certaines isoformes (Weinstein et al., 1987 ; Lammers and Jamieson, 1989, Shaper et al., 1986 ; Yadav and Brew, 1991). Afin de vérifier si ces variations de la région stem de l' α 1,3GT pourraient modifier la localisation dans le Golgi, la localisation cellulaire des différentes isoformes a été analysée. Les quatre vecteurs d'expression basés sur le CMV décrits ci-dessus, expriment les isoformes α 1,3 GT avec un marqueur FLAG fusionné à l'extrémité C-terminale ce qui permet de détecter la protéine par immunofluorescence indirecte dans les cellules HeLa transfectées avec un anticorps anti-FLAG. Comme observé par microscopie à fluorescence, les quatre isoformes sont localisées de façon similaire et forment une structure juxtanucléaire compacte correspondant à celle de l'appareil de Golgi (Roth et Berger, 1982). De façon surprenante, alors que 100 % des cellules expriment l'enzyme, comme cela a été mis en évidence par coloration uniforme obtenue avec la lectine IB4, l'enzyme n'est pas détectable sur la totalité de ces cellules en utilisant l'anticorps anti-FLAG. Cela peut être due à une expression irrégulière de l'enzyme associée à une sensibilité limitée de l'anticorps, ou à la réorganisation de l'appareil de Golgi durant le cycle cellulaire.

25 d) Expression des isoformes de l' α 1,3GT

30 L'épitope Gal α 1,3Gal, résultant de l'activité de l' α 1,3GT, n'est pas exprimé de façon homogène dans les tissus de porc (Oriol et al., 1993). Dans le but d'étudier ces variations au niveau enzymatique, le niveau des transcripts α 1,3GT a été étudié par Northern blot, et la distribution des isoformes a été étudiée par test de protection à la RNase.

5 L'analyse par Northern blot montre l'expression dans tous les tissus étudiés, mais avec une différence frappante entre les tissus. Les reins contiennent environ 50 % de ce que l'on trouve dans la rate, le thymus 40 % et le coeur et les ovaires, 20 à 25 %. Les poumons et le foie contiennent moins de 10 % de ce qui a été trouvé dans la rate. La stimulation des cellules endothéliales avec les cytokines inflammatoires induit une augmentation de la régulation ou la synthèse de beaucoup de gènes, dont les molécules d'adhésion, à savoir les molécules liées à l'inflammation et la coagulation. Une augmentation de la régulation de l' α 1,3GT n'a jamais été décrite dans les 10 cellules endothéliales. En utilisant des PAEC stimulées pendant 6 heures avec 100 U/ml de TNF α humain, une augmentation de deux fois le niveau global d'ARNm codant pour l' α 1,3GT a été observée. L'incubation des PAEC en présence de cycloheximide augmente également le niveau d'ARNm codant pour l' α 1,3GT probablement par stabilisation du messager. De façon surprenante, la 15 stimulation par TNF α + cycloheximide ne conduit pas à une augmentation du niveau de l'ARNm codant pour l' α 1,3GT, mais plutôt à une légère diminution.. Cet effet est peut-être relié à la découverte du fait que la cycloheximide facilite l'apoptose due au TNF α conduisant à une diminution de la régulation de certains antigènes (Malorni et al., 1993).

20 L'expression des isoformes de l' α 1,3GT a été analysée par test de protection à l'ARNase dans les tissus de porc. Deux sondes antisens radiomarquées ont été utilisées pour analyser les quatre espèces d'ARN identifiées.

25 Le transcript de l'ARNm de l'isoforme 1 hybride avec un fragment de 273 pb sur la sonde 1 correspondant à une séquence délimitée par les nucléotides 7 à 266 sur le transcript (les numéros des nucléotides correspondent à la séquence représentée sur la figure 1, isoforme 1). L'hybridation de la sonde 1 avec l'ARNm codant pour l'isoforme 2 conduit à un fragment de 87 pb délimité par les nucléotides - 7 à 80, et un fragment plus grand de 150 pb délimité par les nucléotides 117 à 266. L'hybridation de la sonde 1 avec l'ARNm codant pour l'isoforme 3 conduit à un fragment de 123 pb délimité par les nucléotides - 7 à 116 et un plus petit fragment de 87 pb délimité par les nucléotides 180 à 266. L'hybridation de la sonde 1 avec l'ARNm de l'isoforme 4 de l' α 1,3 GT conduit à deux fragments de 87 pb délimités par les nucléotides - 7 à 80 et par les nucléotides 180 à 266. La deuxième sonde, sonde 4, est un fragment d'ARNm de 174 pb correspondant à l'isoforme 4. Il est entièrement protégé par l'ARNm codant pour l'isoforme 4, et conduit à deux fragments de 87 pb avec les isoformes 1, 2 et 3.

Les fragments de sonde protégés par les ARNm codant pour les isoformes 1, 2 et 3 sont ceux de 273, 150 et 123 pb, respectivement, la sonde 4 protégée par l'ARNm codant pour l'isoforme 4 conduit à une bande de 174 pb. La répartition des produits de transcription diffère d'un tissu à un autre : dans le rein, l'isoforme 3 seule est exprimée, alors que dans les ovaires, seule l'isoforme 4 est exprimée. Dans le cœur, les poumons et la rate, on trouve les isoformes 1 et 2, alors que les isoformes 2 et 4 sont trouvées dans le foie. Les cellules endothéliales expriment les isoformes 1, 2 et 4. Dans les thymus, on peut observer les 4 isoformes.

10

II - Transformation de cellules animales à l'aide de séquences nucléotidiques codant pour des anticorps anti- α 1,3 GT selon l'invention

15

1) Matériels et méthodes

a) Banques d'ADNc, cellules et plasmides :

La banque d'ADNc provient de cellules épithéliales porcines LLC-PK1. Elle est construite dans le vecteur pCDNA-1. Les souches bactériennes utilisées sont: *E. coli-TG1 sup E*, *E. coli-XL-1*, SURE, M15, MC 1061/P3, et DH5 α . Le plasmide d'expression procaryote pQE-30 vient de Qiagen. Le plasmide d'expression eucaryote pCDAAS-9, contient un gène de résistance à la néomycine et entraîne la transcription d'ADNc qu'il porte sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus. La banque d'immunoglobulines humaines ScFv est construite dans le plasmide pHEN-1 et a été utilisée comme décrit dans l'article de Nissim et al., 1994. La préparation des phages recombinants est également décrite

30

b) Système d'expression recombinante et purification :

Le système de production et de purification de l' α 1,3GT recombinante provient de Qiagen. La transcription a été induite par culture des *E.coli*-M15 transformées par l'ADNc de l'enzyme avec 2mM IPTG, pour 5 heures. La protéine recombinante dans le lysat cellulaire a été alors purifiée sur une colonne échangeuse d'ions, en conditions dénaturantes. La protéine purifiée a été dialysée en PBS et stockée à -20°C jusqu'à son utilisation.

c) ELISA :

Des plaques de microtitration (Nunc) ont été glacées une nuit à 4°C avec 5 μ /ml de protéine α 1,3GT purifiée, en tampon carbonate à pH 9,5. Elles ont ensuite été saturées 2h à 37°C en 2% lait écrémé, puis incubées 2h, 37°C avec une suspension de phages recombinants exprimant un fragment ScFv d'anticorps provenant de la banque ScFv. Après lavage, les plaques ont été incubées 1h, 37°C avec un anticorps anti-phage M13 marqué à la peroxydase (Pharmacia), dilué 1/500. La révélation a été effectuée par réaction de la peroxydase avec de la diaminobenzidine en présence d'eau oxygénée.

10

d) Transfection et cellules porcines :

Des cellules de porc LLC-PK1 ont été transfectées avec des plasmides pCDAAS portant l'ADNc de clones anti- α 1,3 GT positifs. La transfection a été réalisée par électroporation d'un mélange de 500.000 cellules et de 20 μ g d'ADN plasmidique, à 250V et 350 μ F. Les clones ont été sélectionnés par culture de 15 jours en présence de 1500 μ /ml de néomycine (G418), isolés à l'aide d'anneaux de clonage et cultivés séparément en présence de G418 jusqu'à l'analyse.

20

e) Immunofluorescence et cytofluorométrie :

Les cellules ont été marquées par l'isolectine B4 de *Bandeiraea simplicifolia* marquée à la fluorescéine (IB-4-FITC, Sigma), lectine spécifique des structures α -galactose: les cellules ont été lavées à 4°C en PBS-2%BSA, incubées à 4°C pendant 30 mn. avec 20 μ g/ml IB-4-FITC, relavées 3 fois et analysées par cytofluorométrie en utilisant un FACS-can (Becton Dickinson).

25

f) Séquence :

30

Les réactions de séquence ont été effectuées avec la D-taq (Amersham), en utilisant comme amorces deux oligonucléotides situés dans la partie 5' du segment V λ 3. Oligo 1, permettant la lecture de la partie 5' de l'ADNc 5'-TTCTGAGGCTGTCCTT-3'. Oligo 2, permettant la lecture de la partie 3' de l'ADNc 5'-ATCGTCTGAGCTGACTCA-3'.

35

g) Ciblage moléculaire des ScFv anti- α 1,3-GT dans le Golgi :

Dans le but de faire exprimer les anticorps ScFv dans le même compartiment cellulaire que l' α 1,3 GT, c'est-à-dire dans le Golgi, des séquences signal et de rétention golgienne ont été ajoutées aux clones ScFv, en N-terminal et en C-terminal, respectivement. Les séquences signal et de

rétenion choisies ont été adaptées à partir des données rapportées par Richardson et al., 1995. Elles ont été introduites par amplification PCR des clones ScFv de départ, à l'aide d'amorces contenant l'ADNc de ces séquences, et des sites de restriction pour le clonage. La séquence de ces amorces est la suivante :

- amorce encodant la séquence signal :

5'-TTTGAATTATGGAAAGGCAGTGGATCTTCTCTCCAGGT
GCAGCTGGTGCAG-3'.

- amorce encodant la séquence de rétenion golgienne:

5'-TTTCTCGAGTTATTACAGCTCGCCTTCGCTACCTAGGA
CGGTGCAGCTT-3'.

2) RESULTATS

a) Clonage de l' α 1,3GT de porc

Un fragment de 313bp correspondant à l'extrémité 5' de l'ADNc de l' α 1,3GT de porc a été amplifié par RT-PCR à partir d'ARN de cellules endothéliales aortiques de porc. Ce fragment a servi de sonde pour le clonage de l'ADNc entier dans une banque de cellules épithéliales de porc exprimée en *E. Coli* MC1061 P3, dans le plasmide pCDNA-1. Le clone isolé mesure environ 2Kb, comporte une partie 5' non codante de 147 pb suivie d'une phase ouverte de lecture de 1104 pb et d'une partie 3' non codante d'environ 750 pb. Il correspond à l'isoforme de l'enzyme dont l'exon 5 est absent (à savoir l'isoforme 2 représentée par SEQ ID NO 4). L'ADNc porcin isolé est fonctionnel car il confère une activité α 1,3GT à des cellules Cos, naturellement dépourvues de cette activité, après transfection. Cette activité peut être démontrée par l'acquisition d'une réactivité avec l'isolectine B4 de *Bandeiraea simplicifolia*, marquant spécifiquement les résidus α -galactosylés.

b) Expression protéique de l' α 1,3GT recombinante.

La partie codante de l' α 1,3GT a été sous-clonée par PCR dans le vecteur d'expression procaryote pQE30 (Qiagen), en fusion en 5' avec une queue de six histidines servant à la purification de la protéine recombinante sur une matrice chargée (Ni-NTA). Le clone ainsi obtenu a été entièrement séquencé pour s'assurer de l'absence de mutations par rapport au clone de départ, qui auraient pu être introduites lors de l'amplification PCR. Le plasmide pQE30- α 1,3GT a été introduit dans *E. Coli* M15 et la protéine recombinante produite *in vitro* par induction de la transcription à l'IPTG, et purifiée.

c) Production d'anticorps ScFv anti- α 1,3GT

La banque d'immunoglobulines (Ig) humaines est constituée par 50 séquences de parties variables de chaînes lourdes d'Ig en configuration germinale, associées à un peptide contenant de 4 à 12 acides aminés aléatoires, codant par la partie CDR3 de la chaîne lourde, et insérées dans le phagémide pHEN1-V λ 3, en fusion avec la partie plasmidique codant pour la protéine g3p de l'enveloppe phagique. Les phages pouvant être dérivés de ces plasmides expriment donc un fragment (ScFv) d'Ig fonctionnel en fusion avec une protéine d'enveloppe, et se comportent, au niveau de leur propriétés de reconnaissance d'un antigène, comme l'Ig dont ils expriment la séquence. Les phages dérivés de cette banque d'Ig ont fait l'objet de 4 tris successifs par "panning" sur la protéine recombinante purifiée, comme décrit dans Nissim et al., 1994

d) Test ELISA de la positivité des anticorps ScFv anti- α 1,3GT.

Quatre-vingt-seize colonies individuelles de bactéries *E. Coli*-TG1 *supE* contenant chacune un clone pHEN1-ScFv ont été isolées, de manière aléatoire, après les 4 cycles d'enrichissement à l'encontre de la protéine α 1,3GT. Ces colonies ont été cultivées une nuit dans 200 μ l de milieu LB, en plaque de microtitration. Le surnageant, contenant des phages exposant sur leur enveloppe 1 à 3 molécules de fragment ScFv d'anticorps, a été testé par ELISA pour mesurer la réactivité relative des différents clones à l'encontre de l' α 1,3GT. Sur les 96 clones testés, 15 montraient une réactivité supérieure à trois fois le niveau du contrôle (Figure 2). Les six clones les plus positifs ont été réamplifiés et des phages purifiés ont été préparés à partir de 500 ml de surnageant de bactéries TG-1. Les phage purifiés, et concentrés par précipitation et resuspension en PBS ont un titre supérieur à 10¹⁰ cfu/ml. Cette préparation de phages concentrés a été re-testée en ELISA. Les résultats, montrés à la figure 2, reproduisent l'ordre de réactivité observé dans la Fig. 2.

e) Séquence de l'ADNc des fragments d'anticorps ScFv anti- α 1,3GT

Les clones ScFv anti- α 1,3GT sélectionnés ont été séquencés pour s'assurer de la non introduction d'erreurs lors du sous-clonage par PCR et pour déterminer les associations chaîne lourde génomique-peptide aléatoire (de 4 à 12 acides aminés)-chaîne légère V λ 3 qui produisent un anticorps réactif à l'encontre de l' α 1,3GT. Sur les six séquences analysées, deux sont identiques (n° 2 et 6), et deux ne diffèrent que par deux acides aminés dans la partie CDR3 (n° 1 et 5). La séquence n° 3 présente un codon ambre (codon reconnu comme un stop traductionnel dans un système eucaryote, mais considéré comme une

glutamine dans la souche *E. coli*-TG1 *supE* utilisée pour le clonage) à la jonction CD3-peptide linker reliant les chaînes lourdes à la chaîne légère V λ 3. Un codon stop à cette position est une conséquence prévisible de l'association aléatoire des fragments d'ADNc qui se produit lors de la fabrication de la banque ScFv. Le remplacement du nucléotide T en position 313 par un C permet d'obtenir un codon correspondant à une glutamine en position 105 (voir SEQ ID NO 13). Les chaînes lourdes (désignées séquences VH) sélectionnées ainsi que la séquence des régions CDR3 sont décrites dans le tableau 1; la séquence de clone ScFv1 correspond à la séquence représentée par SEQ ID NO 9, la séquence du clone ScFv2 et celle du clone ScFv6 correspondent à la séquence représentée par SEQ ID NO 11, la séquence du clone ScFv3 correspond à la séquence représentée par SEQ ID NO 13, la séquence du clone ScFv4 correspond à la séquence représentée par SEQ ID NO 15 et la séquence du clone ScFv5 correspond à la séquence représentée par SEQ ID NO 17.

15

Tableau 1

20	Clone n°	Segment VH	Séquence CDR3
	ScFv1	DP - 25	Ser - Gly - Met - Phe
	ScFv2	DP - 5	Pro - Glu - Ile - Asp - Gln
	ScFv3	DP - 21	Ser - Asn - Asp - Pro - Ala -
25			Asp - Glu
	ScFv4	DP - 51	Ala - Trp - Arg - Thr - Asp
	ScFv5	DP - 25	Ser - Gly - Val - Tyr
	ScFv6	DP - 5	Pro - Glu - Ile- Asp - Gln

30 Séquences VH d'origine génomique et CDR3 des anticorps synthétiques spécifiques de l' α 1,3GT porcine: Les séquences nucléotidiques des clones ScFv sélectionnés en ELISA pour leur affinité à l'encontre de l' α 1,3GT de porc ont été effectuées. Le tableau montre les séquences des troisièmes régions de complémentarité des anticorps (CDR3). La nomenclature des segments variables des chaînes lourdes en configuration germinale est celle utilisée dans Tomlinson et al., 1992.

35

g) Evaluation de l'efficacité de l'immunisation intracellulaire

5 Les ADNc codant pour les anticorps anti- α 1,3GT n° 1 à 6, natifs ou possédant les séquences signal et de localisation golgienne, ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression eucaryote pCDAAS, sous le contrôle du promoteur de CMV. Pour tester la conséquence de l'expression des ScFv anti- α 1,3GT sur la diminution de l'expression de l'épitope α -galactosyl sur la membrane des cellules de porc, des cellules LLC-PK1 ont été transfectées avec les différents plasmides pCDAAS-ScFv, et des clones ont été isolés. La présence de l'épitope xénoantigénique α -galactosyl a été évaluée en immunofluorescence avec la lectine IB4-FITC (spécifique du galactose branché en configuration α), en comparaison avec les mêmes cellules, non transfectées. Les résultats montrent que l'anticorps ScFv n° 2 (à savoir celui représenté par SEQ ID NO 12) encodant la séquence VH DP-5, associée une partie CD3 artificielle composée des acides aminés PEIDQ, reliée à la séquence V λ 3, sans adjonction de séquences signal et de rétention golgienne, lorsqu'il est exprimé dans une cellule de porc, entraîne jusqu'à 95% de diminution de l'expression du galactose branché en configuration α . En effet, la fluorescence moyenne des cellules LLC-PK1 est de 465 unités lorsque le marquage est réalisé avec 20 μ g/ml IB-4-FITC, et elle tombe à 49 unités pour le clone LLC-PK1-ScFv6.

20 En conclusion, dans le contexte de la xénotransplantation, la possibilité d'inhiber dans une cellule de porc l'expression de l' α 1,3GT en utilisant cette technique, conduit à des applications très claires : la disponibilité de porcs transgéniques n'exprimant pas ou peu d'épitopes α -galactosyl, conséquence de l'inhibition de l' α 1,3GT, et exprimant un inhibiteur du complément humain, comme cela existe déjà, permet d'effectuer des xénogreffes en évitant la réaction des cellules du greffon avec les anticorps et avec le complément du receveur humain.

25 30 Les résultats qui sont présentés ci-dessus, montrent que des cellules d'origine porcine exprimant un anticorps ScFv anti- α 1,3GT peuvent être obtenues, et que cette expression résulte en une diminution importante du niveau de xénoépitopes exprimés

III - Anticorps monoclonaux anti- α 1,3GT

35 La partie codante de l' α 1,3GT, isoforme n° 2 a été sous-clonée par PCR dans le vecteur d'expression procaryote pQE30 (Qiagen), en fusion en 5' avec une queue de six histidines servant à la purification de la protéine recombinante

sur une matrice chargée (Ni-NTA). Le clone ainsi obtenu a été entièrement séquencé pour s'assurer de l'absence de mutations par rapport au clone de départ, qui auraient pu être introduites lors de l'amplification PCR. Le plasmide pQE30- α 1,3GT a été introduit dans *E. Coli* M15 et la protéine recombinante produite *in vitro* par induction de la transcription à l'IPTG. Après purification, l' α 1,3GT a été dialysée en PBS et injectée à une souris BALB/C à raison de 3 injections de 40 μ g chacune tous les 15 jours. Les lymphocytes spléniques ont été collectés et fusionnés avec l'hybridome de souris SP2-O. La sélection des hybridomes sécrétant une immunoglobuline reconnaissant l' α 1,3GT s'est effectuée par test ELISA: des plaques de microtitration ont été glacées avec 10 microg/ml de protéine α 1,3GT recombinante, 16h à 4°C à pH 9.5, puis saturées 2h, 37°C avec PBS-BSA1%, Tween 20 0.5%. Les surnageants de hybridomes ont été incubés 1h, 37°C et les anticorps immunoabsorbés révélés à l'aide d'un anti-Ig marqué à la peroxydase. Les hybridomes fournissant une densité optique au moins trois fois supérieure au bruit de fond ont été retenus.

IV - Clonage d'anticorps ScFv (Single chain Fv) à partir d'hybridomes

Le clonage de fragments d'immunoglobulines sous forme de fragments ScFv est décrit dans Clackson et al. (1991)). En bref, de l'ARN est préparé à partir de 5×10^8 cellules d'hybridome, et l'ARN messager est sélectionné sur oligo(dT)-cellulose. Un premier brin d'ADNc est synthétisé comme suit : 10 μ g d'ARNm sont incubés avec 20 pmoles des oligos VH1FOR ou VK1FOR (Clackson et al., 1991), 250 μ M de chaque dNTP, 10 mM DTT, 100 mM Tris.HCl (pH 8.3), 10 mM MgCl₂, et 140 mM KCl, 10 min. à 70°C, puis 1h à 42 °C en présence de 50 unités de Transcriptase Reverse. L'amplification par PCR des fragments VH et VL est réalisée en mélangeant 2 μ l de réaction RT avec 25 pmoles des amorces VH1FOR ou VK1FOR, et VH1BACK ou VK1BACK (Clackson et al., 1991), 250 μ M de chaque dNTP, 67 mM Tris.HCl (pH 8.8), 17 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM MgCl₂, et 2 unités de Taq polymérase, pour 30 cycles d'amplification. Les fragments obtenus sont alors purifiés et 1 μ g de chaque sont mélangés avec 300 ng de linker (gly4Ser)3, et amplifiés par 7 cycles de PCR destinés à relier les fragments. Les fragments VH et VL reliés sont alors amplifiés en 20 cycles avec les oligos VH1BACK et VK4FOR. Les fragments obtenus sont alors ré-amplifiés avec les oligos VH1BACK-BamH1 et VK4FOR-BamH1, digérés par BamH1 et clonés dans le vecteur d'expression eucaryote PCDAAS, sous le contrôle du promoteur CMV.

V -Voies d'action intracellulaire des anticorps anti- α 1,3GT

Le mécanisme moléculaire par lequel un anticorps exprimé dans une cellule interfère avec la fonction d'une molécule portant le site antigénique contre lequel cet anticorps est exprimé n'est pas élucidé. Cependant, plusieurs explications ont été proposées. Dans le cas de l'inhibition de la reverse transcriptase de HIV (Maciejewski et al., 1995), l'anticorps anti-RT n'est pas neutralisant dans un test *in vitro*. Les auteurs proposent que le complexe antigène/anticorps formé dans la cellule puisse bloquer stériquement le mouvement de l'enzyme le long de la molécule d'ARN, ou bien puisse modifier sa structure secondaire. Dans le cas de l'inhibition de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (Richardson et al., 1995), un processus de dégradation du complexe antigène/anticorps a été proposé. Ce processus semble non lysosomial, car la méthionine méthyl ester (un inhibiteur lysosomial) n'entraîne pas d'accumulation du complexe. La dégradation ne se produit pas non plus dans le compartiment Golgien car la brefeldin A (qui détruit le Golgi) est sans effet. La dégradation se produit donc précocement, sans doute au niveau du réticulum endoplasmique. Dans plusieurs cas où la localisation intracellulaire de la molécule cible conditionne sa fonction, il est possible que l'anticorps intracellulaire retienne cette molécule dans un compartiment qui lui est étranger. Richardson et al. ont en effet montré que l'expression d'un anticorps anti-RT, retenu dans le réticulum endoplasmique par incorporation d'une séquence de rétention KDEL, retient la RT dans ce compartiment.

Dans le cas de l'inhibition de l' α 1,3GT par des anticorps ScFv, on peut supposer que : 1) soit les anticorps modulent l'activité de l'enzyme (par exemple en modifiant sa structure), 2) soit ils la retiennent dans un compartiment intracellulaire autre que le trans-Golgi (compartiment dans lequel le branchement de galactose en α 1,3 sur le galactose du N-acéyllactosamine est effectué), 3) soit ils entraînent la dégradation du complexe antigène/anticorps par un mécanisme non élucidé. Il pourrait s'agir par exemple d'une ubiquitination suivie d'une dégradation par le complexe protéasome.

VI - Construction d'animaux transgéniques avec les ScFv proposés

L'obtention d'animaux transgéniques pour un ScFv anti- α 1,3GT présente des intérêts en recherche et en clinique. Pour la recherche, la transgenèse chez le rat convient particulièrement car ses organes peuvent être greffés chez le singe, où ils subissent un rejet semblable au rejet de xénogreffe dans le modèle

porc-primate Pour l'utilisation thérapeutique de greffons, le porc est l'animal de choix.

a) Transgenèse chez le rat :

Les embryons au stade unicellulaire sont obtenus à l'issue d'un protocole de super-ovulation appliqué à des rates de souche CD âgées de 28 à 38 jours (Amstrong et Opavoky, 1988). Ce protocole permet d'obtenir de façon régulière une moyenne de 40 à 50 embryons par femelle. La construction portant l'ADNc codant pour l'anticorps anti- α 1,3GT (deux exemples de constructions pouvant être utilisées sont montrés sur les figures 4 et 5) est injectée à raison de quelques milliers de copies par embryon. Les embryons traités sont alors réimplantés dans la matrice. Les rats issus de ces embryons sont ensuite testés pour sélectionner les animaux ayant effectivement incorporé dans leur génome l'ADN transgénique. Ces tests sont effectués au niveau de l'ADN et de l'ARN, que l'on peut détecter par hybridation avec une sonde ADN correspondant au transgène, et au niveau protéique. La détection de la protéine ScFv peut être effectuée par réaction avec un anticorps anti Fab humain, ou par un anticorps anti-épitope, si l'ADNc ScFv est en fusion avec un ADNc codant pour un peptide portant cet épitope.

20

b) Transgenèse chez le porc :

Des embryons fécondés au stade pronucléaire sont obtenus par laparotomie à partir des oviductes de truies matures âgées de 7 à 10 mois, 50 heures après l'induction de la superovulation et 20 à 26 heures après l'insémination. Le Pronucleus, dans lequel est injecté l'ADN, est visualisé par une centrifugation de l'ovocyte à 15000 g pendant 3 minutes. Les résultats après réimplantation d'ovocytes traités de cette manière montrent que 10 % d'entre eux se développent et donnent un animal, et que 15 % d'entre eux ont incorporé l'ADN transgénique, soit 1,5 % des ovocytes traités. Parmi ces animaux positifs quant à l'intégration d'ADN, 67 % expriment effectivement la protéine correspondant au transgène (White et al., 1994; Cozzi et White, 1995).

25

30

35

Légendes des figures :

35

- Figure 1 :

Analyse des séquences des transcripts des isoformes de l' α 1,3GT de porc, et alignement sur une carte de transcript primaire murine. Les ADNc des isoformes 1, 3 et 4 ont été clonés à partir d'ARNm rétrotranscripts et amplifiés

par PCR provenant de PAEC et l'ADNc correspondant à l'isoforme 2 a été cloné à partir d'une banque LLC-pK1, comme décrit ci-dessus. La séquence nucléotidique a été déterminée par utilisation de Séquenase (USB), et comparée par contrôle avec les séquences correspondant aux isoformes 1 et 2 décrites par Strahan et al., 1995 et Sandrin et al., 1994. Les numéros en gras sur le côté gauche de la figure correspondant aux isoformes 1 à 4. Les premières bases des exons 5, 6 et 7 sont numérotées sur la séquence correspondant à l'isoforme 1. Les chiffres représentés en italique indiquent le nombre de bases manquantes dans l'exon épissé correspondant. La carte primaire de transcription de la souris avec ses 9 exons, telle que décrite par Joziasse et al., 1992, est comparée avec les séquences des isoformes 1 à 4.

La queue cytoplasmique (encadré noir) et la région transmembranaire (encadré avec lignes verticales) sont codées par l'exon 4. Les régions d'origine (encadré grise) comprend les exons 5 et 6. Les exons 5 et 6 sont épissés alternativement chez la souris et le porc. Le domaine catalytique est codé par les exons 7, 8 et 9.

- Figure 2 :

Réactivité mesurée par ELISA de préparations non purifiées de phages correspondant à 15 clones reconnaissant la protéine α 1,3GT: Quatre vingt seize colonies individuelles de bactéries TG1 contenant un clone pHEN-1-ScFv, présélectionnées par une procédure d'enrichissement décrite dans Nissim et al., 1994, ont été cultivées et leur surnageant (contenant les phages exprimant l'anticorps) testé en ELISA comme décrit dans Matériels et Méthodes ci-dessus. Les 15 surnageants positifs (numérotés 1 à 15) sont représentés en abscisse sur la figure. Le contrôle négatif (-) est constitué d'un blanc et le contrôle positif (+) par la mesure de la densité optique obtenue par la réaction d'un phage M13 (Pharmacia) sur une IgG de souris anti-phage M13 (Pharmacia) déposée sur la plaque. Les valeurs de densité optique (DO) sont indiquées en ordonnée.

- Figure 3 :

Réactivité mesurée par ELISA de phages purifiés correspondant à 6 clones reconnaissant la protéine α 1,3GT: Les six clones les plus positifs dans l'ELISA ci-dessus (Fig.2) ont été amplifiés en vue de la préparation de phages purifiés. Les phages purifiés et concentrés ont été re-testés en ELISA, de manière similaire à ce qui est décrit dans la figure 2. Ces phages ont été testés à une dilution de 1 à 1/8. Les dilutions effectuées sont représentées en abscisse, et la

densité optique (DO) mesurée est indiquée en ordonnée. la courbe correspondant au contrôle positif passe par des points représentés par des croix, celle correspondant au phage contenant ScFv1 (M13-ScFv1) passe par des points représentés par un point noir au centre de carrés blancs, celle correspondant au phage contenant ScFv2 (M13-ScFv2) passe par des points représentés par des losanges noirs, celle correspondant au phage contenant ScFv3 (M13-ScFv3) passe par des points représentés par des points représentés par un point blanc au centre de carrés noirs, celle correspondant au phage contenant ScFv4 (M13-ScFv4) passe par des points représentés par des losanges blancs, celle correspondant au phage contenant ScFv5 (M13-ScFv5) passe par des points représentés par des carrés noirs, celle correspondant au phage contenant ScFv6 (M13-ScFv6) passe par des points représentés par des carrés blancs, le blanc étant représenté par un rond noir.

- Figure 4 :

Cet exemple de construction consiste en l'utilisation du promoteur du CMH-1 de souris H-2Kb, permettant l'insertion du transgène (ADNc ScFv ; 0,7Kb) entre la partie promotrice proprement dite (promoteur H-2kb ; 4Kb) et une série d'introns/exons (5,5 Kb) appartenant au gène H-2Kb, cette série étant suivie par pA SV40 de 0,3 Kb. Ces introns contiennent des séquences régulatrices permettant d'obtenir une bonne activité du promoteur, et donc une bonne expression du transgène. Le promoteur H-2Kb permet une expression constitutive et ubiquitaire de l'ADNc dont il contrôle l'expression (Kimura et al., 1986; Byrne et al., 1995).

- Figure 5 :

Cet exemple de construction consiste en l'utilisation du minigène DAF (Cozzi et al., 1996), dont l'efficacité a déjà été démontrée en transgenèse chez le porc. De manière analogue à la construction H-2Kb, ce minigène place l'ADNc ScFv (0,7 Kb) sous le contrôle du promoteur du DAF, lui-même contrôlé par des séquences introniques (l'ensemble constitué par le promoteur DAF, les exons et les introns représentant 4,6 Kb), l'ADNc ScFv étant suivie par pA SV40 de 0,3 Kb.

REFERENCES

Allan, J.S. Xenotransplantation at a crossroads: prevention versus progress. *Nature Medicine* 2, 18-21 (1996).

5 Armstrong, D. T., and M. A. Opavoky. 1988. Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 39:511.

10 Bach, F.H. et al. Barriers to xenotransplantation. *Nature Medicine* 1, 869-873 (1995).

15 Byrne, G. W., K. R. McCurry, D. Kagan, C. Quinn, M. J. Martin, J. L. Platt, and J. S. Logan. 1995. Protection of xenogenic cardiac endothelium from human complement by expression of CD59 or DAF in transgenic mice. *Transplantation* 60:1149-1156.

20 Carrington, C.A. et al. Expression of human DAF and MCP on pig endothelial cells protects from human complement. *Transpl. Proc.* 27, 321-323 (1995).

Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, and G. Winter. 1991. 25 Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352:624-628.

Cozzi, E., and D. J. G. White. 1995. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nature Medicine* 1:964-966.

30 Cozzi, E., Langford, G.A., Pino-Chavez, G., Wright, L., Levy, N., Miller, N., Davies, H., Chatterjee, M., Lancaster, R., Tolan, M.J., White, D.J.G. 1996. Longitudinal analysis of the expression of human decay accelerating factor (HDAF) on lymphocytes, in the plasma, and in the skin biopsies of transgenic pigs. *Xenotransplantation*, 3 128-133.

Dahdal, R. Y., and Colley, K.J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268 (35), 26310-26319

35 DePamphilis, M.L., Herman, S.A., Martinez-Salas, E., Chalifour, L.E., Wirak, D.O., Cupo, D.Y., Miranda, M., 1988. Microinjecting DNA into

mouse ova to study DNA replication and gene expression and to produce transgenic animals. *BioTechniques*, 6, 662-680.

5 Guerif, F., Anegon, L., Mauff, B.L., Soullou, J.P., and Pourcel, C.
(1995) *Transl. Proc.* 27, 2491

Joziasse, D.H., Shaper, N.L., Kim, D., Eijnden, D.H.V. d., and Shaper, J.H. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 (8), 5534-5541

10 Kimura, A., A. Israël, O. L. Bail, and P. Koursilsky. 1986. Detailed analysis of the mouse H-2K^b promoter: enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression. *Cell* 44:261-272.

Lammers, G., and Jamieson, J.C. (1989) Biochem. J. 261, 389-393

15

Maciejewski, J. P., F. F. Weichold, N. S. Young, A. Cara, D. Zella, M. S. Reitz, and R. C. Gallo. 1995. Intracellular expression of antibody fragments directed against HIV reverse transcriptase prevents HIV infection in vitro. *Nature Medicine* 1:667-673.

20

Malorni, W., Rivabene, R., Santini, M.T., Paradisi, S., Losi, F., and Donelli, G. (1993) FEBS Lett 336, 335-339

Melton, D.A., Krieg, P.A. Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M.R. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 7035-7056

Nissim, A. et al. Antibody fragments from a single pot phage display library as immunological reagents. EMBO J. 13, 692-698 (1994).

50

Oriol, R., Ye, Y., Koren, E., and Cooper, D. K. C. (1993)
Transplantation 56, 1433-1442

Richardson, J.H., Sodroski, J.G., Waldman, T.A. & Marasco, W.A. Phenotypic knock out of the high-affinity interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the alpha subunit of the receptor. Proc. Natl. Acad. U. S. A. 92, 3137-3141 (1995).

Roth, J., and Berger, E.G. (1982) J. Cell. Biol. 93, 223-229

5 Sandrin, M.S., Vaughan, H.A., Dabkowski, P.L. & McKenzie, I.F.C. Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha1-3)Gal epitopes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 11391-11395 (1993).

10 Sandrin, M.S. Dabkowski, P.L. Henning, M.M. Mouhtouris, E., and McKenzie, I.F.C. (1994) Xenotransplantation 1, 81-88

15 Shaper, N.L. Shaper, J.L., Meuth, J.L., Fox, J.L., Chang, H., Kirsh, I. R., and Hollis, G. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 1573-1577

Strahan, K. M., Gu, F., Pearce, A.F., Gustavsson, I., Andersson, L., and Gustavsson, K. (1995) Immunogenetics 41, 101-105

20 Tomlinson, I.M., Walter, G., Marks, J.D., Llewelyn, M.B. & Winter, G. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. J. Mol. Biol. 227, 776-798 (1992).

25 Warren, J.B. (1990) in The endothelium, an introduction to current research. (Warren, ed), pp. 263-272, Wiley-Liss, New-York

Weinstein, J., Lee, E.U., McEntee, K., Lai, P.H., and Paulson, J.C. (1987) J. Biol. Chem. 262 (36), 17735-17743

30 White, D. J. G., E. Gozzi, G. Langford, T. Oglesby, N. M. Wang, L. Wright, and J. Wallwork. 1994. Contrôle du rejet hyperaigu de xénogreffe par modification génétique du donneur. Flammarion Médecine Sciences-Actualités Néphrologiques:1-10.

35 Yadav, S.P. and Brew, K. (1991) J. Biol. Chem. 266, 698-703

Zipfel, P.F. Irving, S.G. Kelly, K., and Siebenlist, U. (1989) Mol. Cell. Biol. 9, 1041-1048

32
LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INSERM
- (B) RUE: 101, rue de Tolbiac
- (C) VILLE: Paris
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654 Cedex 13

(ii) TITRE DE L' INVENTION: PROCEDE DE PREPARATION D'ORGANES DE MAMMIFERES NON HUMAINS TRANSGENIQUES EN VUE DE LEUR TRANSPLANTATION CHEZ L'HOMME, ET SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES POUR LA MISE EN OEUVRE DE CE PROCEDE

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 18

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1128 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..1128

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AAT TCG AAA ATA ATG AAT GTC AAA GGA AGA GTG GTT CTG TCA ATG CTG	48
Asn Ser Lys Ile Met Asn Val Lys Gly Arg Val Val Leu Ser Met Leu	
1 5 10 15	
CTT GTC TCA ACT GTA ATG GTT GTG TTT TGG GAA TAC ATC AAC AGC CCA	96
Leu Val Ser Thr Val Met Val Val Phe Trp Glu Tyr Ile Asn Ser Pro	
20 25 30	
GAA GGT TCT TTG TTC TGG ATA TAC CAG TCA AAA AAC CCA GAA GTT GGC	144
Glu Gly Ser Leu Phe Trp Ile Tyr Gln Ser Lys Asn Pro Glu Val Gly	
35 40 45	

33

AGC AGT GCT CAG AGG GGC TGG TGG TTT CCG AGC TGG TTT AAC AAT GGG	192
Ser Ser Ala Gln Arg Gly Trp Trp Phe Pro Ser Trp Phe Asn Asn Gly	
50 55 60	
ACT CAC AGT TAC CAC GAA GAA GAC GCT ATA GGC AAC GAA AAG GAA	240
Thr His Ser Tyr His Glu Glu Glu Asp Ala Ile Gly Asn Glu Lys Glu	
65 70 75 80	
CAA AGA AAA GAA GAC AAC AGA GGA GAG CTT CCA CTA GTG GAC TGG TTT	288
Gln Arg Lys Glu Asp Asn Arg Gly Glu Leu Pro Leu Val Asp Trp Phe	
85 90 95	
AAT CCT GAG AAA CGC CCA GAG GTC GTG ACC ATA ACC AGA TGG AAG GCT	336
Asn Pro Glu Lys Arg Pro Glu Val Val Thr Ile Thr Arg Trp Lys Ala	
100 105 110	
CCA GTG GTA TGG GAA GGC ACT TAC AAC AGA GCC GTC TTA GAT AAT TAT	384
Pro Val Val Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Arg Ala Val Leu Asp Asn Tyr	
115 120 125	
TAT GCC AAA CAG AAA ATT ACC GTG GGC TTG ACG GTT CTT GCT GTC GGA	432
Tyr Ala Lys Gln Lys Ile Thr Val Gly Leu Thr Val Leu Ala Val Gly	
130 135 140	
AGA TAC ATT GAG CAT TAC TTG GAG GAG TTC TTA ATA TCT GCA AAT ACA	480
Arg Tyr Ile Glu His Tyr Leu Glu Glu Phe Leu Ile Ser Ala Asn Thr	
145 150 155 160	
TAC TTC ATG GTT GGC CAC AAA GTC ATC TTT TAC ATC ATG GTG GAT GAT	528
Tyr Phe Met Val Gly His Lys Val Ile Phe Tyr Ile Met Val Asp Asp	
165 170 175	
ATC TCC AGG ATG CCT TTG ATA GAG CTG GGT CCT CTG CGC TCC TTT AAA	576
Ile Ser Arg Met Pro Leu Ile Glu Leu Gly Pro Leu Arg Ser Phe Lys	
180 185 190	
GTG TTT GAG ATC AAG TCC GAG AAG AGG TGG CAA GAC ATC AGC ATG ATG	624
Val Phe Glu Ile Lys Ser Glu Lys Arg Trp Gln Asp Ile Ser Met Met	
195 200 205	
CGC ATG AAG ACC ATC GGG GAG CAC ATC CTG GCC CAC ATC CAG CAC GAG	672
Arg Met Lys Thr Ile Gly Glu His Ile Leu Ala His Ile Gln His Glu	
210 215 220	
GTC GAC TTC CTC TTC TGC ATG GAC GTG GAT CAG GTC TTC CAA AAC AAC	720
Val Asp Phe Leu Phe Cys Met Asp Val Asp Gln Val Phe Gln Asn Asn	
225 230 235 240	
TTT GGG GTG GAG ACC CTG GGC CAG TCG GTG GCT CAG CTA CAG GCC TGG	768
Phe Gly Val Glu Thr Leu Gly Gln Ser Val Ala Gln Leu Gln Ala Trp	
245 250 255	
TGG TAC AAG GCA CAT CCT GAC GAG TTC ACC TAC GAG AGG CGG AAG GAG	816
Trp Tyr Lys Ala His Pro Asp Glu Phe Thr Tyr Glu Arg Arg Lys Glu	
260 265 270	

34				
TCC GCA GCC TAC ATT CCG TTT GGC CAG GGG GAT TTT TAT TAC CAC GCA				864
Ser Ala Ala Tyr Ile Pro Phe Gly Gln Gly Asp Phe Tyr Tyr His Ala				
275	280	285		
GCC ATT TTT GGG GGA ACA CCC ACT CAG GTT CTA AAC ATC ACT CAG GAG				912
Ala Ile Phe Gly Gly Thr Pro Thr Gln Val Leu Asn Ile Thr Gln Glu				
290	295	300		
TGC TTC AAG GGA ATC CTC CAG GAC AAG GAA AAT GAC ATA GAA GCC GAG				960
Cys Phe Lys Gly Ile Leu Gln Asp Lys Glu Asn Asp Ile Glu Ala Glu				
305	310	315	320	
TGG CAT GAT GAA AGC CAT CTA AAC AAG TAT TTC CTT CTC AAC AAA CCC				1008
Trp His Asp Glu Ser His Leu Asn Lys Tyr Phe Leu Leu Asn Lys Pro				
325	330	335		
ACT AAA ATC TTA TCC CCA GAA TAC TGC TGG GAT TAT CAT ATA GGC ATG				1056
Thr Lys Ile Leu Ser Pro Glu Tyr Cys Trp Asp Tyr His Ile Gly Met				
340	345	350		
TCT GTG GAT ATT AGG ATT GTC AAG ATA GCT TGG CAG AAA AAA GAG TAT				1104
Ser Val Asp Ile Arg Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln Lys Lys Glu Tyr				
355	360	365		
AAT TTG GTT AGA AAT AAC ATC TG				1128
Asn Leu Val Arg Asn Asn Ile				
370	375			

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 375 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Asn Ser Lys Ile Met Asn Val Lys Gly Arg Val Val Leu Ser Met Leu				
1	5	10	15	
Leu Val Ser Thr Val Met Val Val Phe Trp Glu Tyr Ile Asn Ser Pro				
20	25	30		
Glu Gly Ser Leu Phe Trp Ile Tyr Gln Ser Lys Asn Pro Glu Val Gly				
35	40	45		
Ser Ser Ala Gln Arg Gly Trp Trp Phe Pro Ser Trp Phe Asn Asn Gly				
50	55	60		
Thr His Ser Tyr His Glu Glu Glu Asp Ala Ile Gly Asn Glu Lys Glu				
65	70	75	80	
Gln Arg Lys Glu Asp Asn Arg Gly Glu Leu Pro Leu Val Asp Trp Phe				
85	90	95		

Asn Pro Glu Lys Arg Pro Glu Val Val Thr Ile Thr Arg Trp Lys Ala
 100 105 110
 Pro Val Val Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Arg Ala Val Leu Asp Asn Tyr
 115 120 125
 Tyr Ala Lys Gln Lys Ile Thr Val Gly Leu Thr Val Leu Ala Val Gly
 130 135 140
 Arg Tyr Ile Glu His Tyr Leu Glu Glu Phe Leu Ile Ser Ala Asn Thr
 145 150 155 160
 Tyr Phe Met Val Gly His Lys Val Ile Phe Tyr Ile Met Val Asp Asp
 165 170 175
 Ile Ser Arg Met Pro Leu Ile Glu Leu Gly Pro Leu Arg Ser Phe Lys
 180 185 190
 Val Phe Glu Ile Lys Ser Glu Lys Arg Trp Gln Asp Ile Ser Met Met
 195 200 205
 Arg Met Lys Thr Ile Gly Glu His Ile Leu Ala His Ile Gln His Glu
 210 215 220
 Val Asp Phe Leu Phe Cys Met Asp Val Asp Gln Val Phe Gln Asn Asn
 225 230 235 240
 Phe Gly Val Glu Thr Leu Gly Gln Ser Val Ala Gln Leu Gln Ala Trp
 245 250 255
 Trp Tyr Lys Ala His Pro Asp Glu Phe Thr Tyr Glu Arg Arg Lys Glu
 260 265 270
 Ser Ala Ala Tyr Ile Pro Phe Gly Gln Gly Asp Phe Tyr Tyr His Ala
 275 280 285
 Ala Ile Phe Gly Gly Thr Pro Thr Gln Val Leu Asn Ile Thr Gln Glu
 290 295 300
 Cys Phe Lys Gly Ile Leu Gln Asp Lys Glu Asn Asp Ile Glu Ala Glu
 305 310 315 320
 Trp His Asp Glu Ser His Leu Asn Lys Tyr Phe Leu Leu Asn Lys Pro
 325 330 335
 Thr Lys Ile Leu Ser Pro Glu Tyr Cys Trp Asp Tyr His Ile Gly Met
 340 345 350
 Ser Val Asp Ile Arg Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln Lys Lys Glu Tyr
 355 360 365
 Asn Leu Val Arg Asn Asn Ile
 370 375

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 1092 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

(A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..1092

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AAT TCG AAA ATA ATG AAT GTC AAA GGA AGA GTG GTT CTG TCA ATG CTG	48
Asn Ser Lys Ile Met Asn Val Lys Gly Arg Val Val Leu Ser Met Leu	
1 5 10 15	
CTT GTC TCA ACT GTA ATG GTT GTG TTT TGG GAA TAC ATC AAC AGA AAC	96
Leu Val Ser Thr Val Met Val Val Phe Trp Glu Tyr Ile Asn Arg Asn	
20 25 30	
CCA GAA GTT GGC AGC AGT GCT CAG AGG GGC TGG TGG TTT CCG AGC TGG	144
Pro Glu Val Gly Ser Ser Ala Gln Arg Gly Trp Trp Phe Pro Ser Trp	
35 40 45	
TTT AAC AAT GGG ACT CAC AGT TAC CAC GAA GAA GAA GAC GCT ATA GGC	192
Phe Asn Asn Gly Thr His Ser Tyr His Glu Glu Glu Asp Ala Ile Gly	
50 55 60	
AAC GAA AAG GAA CAA AGA AAA GAA GAC AAC AGA GGA GAG CTT CCA CTA	240
Asn Glu Lys Glu Gln Arg Lys Glu Asp Asn Arg Gly Glu Leu Pro Leu	
65 70 75 80	
GTG GAC TGG TTT AAT CCT GAG AAA CGC CCA GAG GTC GTG ACC ATA ACC	288
Val Asp Trp Phe Asn Pro Glu Lys Arg Pro Glu Val Val Thr Ile Thr	
85 90 95	
AGA TGG AAG GCT CCA GTG GTA TGG GAA GGC ACT TAC AAC AGA GCC GTC	336
Arg Trp Lys Ala Pro Val Val Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Arg Ala Val	
100 105 110	
TTA GAT AAT TAT TAT GCC AAA CAG AAA ATT ACC GTG GGC TTG ACG GTT	384
Leu Asp Asn Tyr Tyr Ala Lys Gln Lys Ile Thr Val Gly Leu Thr Val	
115 120 125	
CTT GCT GTC GGA AGA TAC ATT GAG CAT TAC TTG GAG GAG TTC TTA ATA	432
Leu Ala Val Gly Arg Tyr Ile Glu His Tyr Leu Glu Glu Phe Leu Ile	
130 135 140	
TCT GCA AAT ACA TAC TTC ATG GTT GGC CAC AAA GTC ATC TTT TAC ATC	480
Ser Ala Asn Thr Tyr Phe Met Val Gly His Lys Val Ile Phe Tyr Ile	
145 150 155 160	

ATG GTG GAT GAT ATC TCC AGG ATG CCT TTG ATA GAG CTG GGT CCT CTG	528
Met Val Asp Asp Ile Ser Arg Met Pro Leu Ile Glu Leu Gly Pro Leu	
165 170 175	
CGC TCC TTT AAA GTG TTT GAG ATC AAG TCC GAG AAG AGG TGG CAA GAC	576
Arg Ser Phe Lys Val Phe Glu Ile Lys Ser Glu Lys Arg Trp Gln Asp	
180 185 190	
ATC AGC ATG ATG CGC ATG AAG ACC ATC GGG GAG CAC ATC CTG GCC CAC	624
Ile Ser Met Met Arg Met Lys Thr Ile Gly Glu His Ile Leu Ala His	
195 200 205	
ATC CAG CAC GAG GTG GAC TTC CTC TTC TGC ATG GAC GTG GAT CAG GTC	672
Ile Gln His Glu Val Asp Phe Leu Phe Cys Met Asp Val Asp Gln Val	
210 215 220	
TTC CAA AAC AAC TTT GGG GTG GAG ACC CTG GGC CAG TCG GTG GCT CAG	720
Phe Gln Asn Asn Phe Gly Val Glu Thr Leu Gly Gln Ser Val Ala Gln	
225 230 235 240	
CTA CAG GCC TGG TGG TAC AAG GCA CAT CCT GAC GAG TTC ACC TAC GAG	768
Leu Gln Ala Trp Trp Tyr Lys Ala His Pro Asp Glu Phe Thr Tyr Glu	
245 250 255	
AGG CGG AAG GAG TCC GCA GCC TAC ATT CCG TTT GGC CAG GGG GAT TTT	816
Arg Arg Lys Glu Ser Ala Ala Tyr Ile Pro Phe Gly Gln Gly Asp Phe	
260 265 270	
TAT TAC CAC GCA GCC ATT TTT GGG GGA ACA CCC ACT CAG GTT CTA AAC	864
Tyr Tyr His Ala Ala Ile Phe Gly Gly Thr Pro Thr Gln Val Leu Asn	
275 280 285	
ATC ACT CAG GAG TGC TTC AAG GGA ATC CTC CAG GAC AAG GAA AAT GAC	912
Ile Thr Gln Glu Cys Phe Lys Gly Ile Leu Gln Asp Lys Glu Asn Asp	
290 295 300	
ATA GAA GCC GAG TGG CAT GAT GAA AGC CAT CTA AAC AAG TAT TTC CTT	960
Ile Glu Ala Glu Trp His Asp Glu Ser His Leu Asn Lys Tyr Phe Leu	
305 310 315 320	
CTC AAC AAA CCC ACT AAA ATC TTA TCC CCA GAA TAC TGC TGG GAT TAT	1008
Leu Asn Lys Pro Thr Lys Ile Leu Ser Pro Glu Tyr Cys Trp Asp Tyr	
325 330 335	
CAT ATA GGC ATG TCT GTG GAT ATT AGG ATT GTC AAG ATA GCT TGG CAG	1056
His Ile Gly Met Ser Val Asp Ile Arg Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln	
340 345 350	
AAA AAA GAG TAT AAT TTG GTT AGA AAT AAC ATC TG	1092
Lys Lys Glu Tyr Asn Leu Val Arg Asn Asn Ile	
355 360	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 363 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Asn	Ser	Lys	Ile	Met	Asn	Val	Lys	Gly	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Met	Leu	
1					5					10				15		
Leu	Val	Ser	Thr	Val	Met	Val	Val	Phe	Trp	Glu	Tyr	Ile	Asn	Arg	Asn	
					20					25				30		
Pro	Glu	Val	Gly	Ser	Ser	Ala	Gln	Arg	Gly	Trp	Trp	Phe	Pro	Ser	Trp	
					35					40				45		
Phe	Asn	Asn	Gly	Thr	His	Ser	Tyr	His	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ile	Gly	
					50					55				60		
Asn	Glu	Lys	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu	Asp	Asn	Arg	Gly	Glu	Leu	Pro	Leu	
					65					70				75		80
Val	Asp	Trp	Phe	Asn	Pro	Glu	Lys	Arg	Pro	Glu	Val	Val	Thr	Ile	Thr	
					85					90				95		
Arg	Trp	Lys	Ala	Pro	Val	Val	Trp	Glu	Gly	Thr	Tyr	Asn	Arg	Ala	Val	
					100					105				110		
Leu	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Gln	Lys	Ile	Thr	Val	Gly	Leu	Thr	Val	
					115					120				125		
Leu	Ala	Val	Gly	Arg	Tyr	Ile	Glu	His	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	Leu	Ile	
					130					135				140		
Ser	Ala	Asn	Thr	Tyr	Phe	Met	Val	Gly	His	Lys	Val	Ile	Phe	Tyr	Ile	
					145					150				155		160
Met	Val	Asp	Asp	Ile	Ser	Arg	Met	Pro	Leu	Ile	Glu	Leu	Gly	Pro	Leu	
					165					170				175		
Arg	Ser	Phe	Lys	Val	Phe	Glu	Ile	Lys	Ser	Glu	Lys	Arg	Trp	Gln	Asp	
					180					185				190		
Ile	Ser	Met	Met	Arg	Met	Lys	Thr	Ile	Gly	Glu	His	Ile	Leu	Ala	His	
					195					200				205		
Ile	Gln	His	Glu	Val	Asp	Phe	Leu	Phe	Cys	Met	Asp	Val	Asp	Gln	Val	
					210					215				220		
Phe	Gln	Asn	Asn	Phe	Gly	Val	Glu	Thr	Leu	Gly	Gln	Ser	Val	Ala	Gln	
					225					230				235		240

39

Leu Gln Ala Trp Trp Tyr Lys Ala His Pro Asp Glu Phe Thr Tyr Glu
 245 250 255

Arg Arg Lys Glu Ser Ala Ala Tyr Ile Pro Phe Gly Gln Gly Asp Phe
 260 265 270

Tyr Tyr His Ala Ala Ile Phe Gly Gly Thr Pro Thr Gln Val Leu Asn
 275 280 285

Ile Thr Gln Glu Cys Phe Lys Gly Ile Leu Gln Asp Lys Glu Asn Asp
 290 295 300

Ile Glu Ala Glu Trp His Asp Glu Ser His Leu Asn Lys Tyr Phe Leu
 305 310 315 320

Leu Asn Lys Pro Thr Lys Ile Leu Ser Pro Glu Tyr Cys Trp Asp Tyr
 325 330 335

His Ile Gly Met Ser Val Asp Ile Arg Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln
 340 345 350

Lys Lys Glu Tyr Asn Leu Val Arg Asn Asn Ile
 355 360

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1065 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..1065

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

AAT TCG AAA ATA ATG AAT GTC AAA GGA AGA GTG GTT CTG TCA ATG CTG	48
Asn Ser Lys Ile Met Asn Val Lys Gly Arg Val Val Leu Ser Met Leu	
1 5 10 15	
CTT GTC TCA ACT GTA ATG GTT GTG TTT TGG GAA TAC ATC AAC AGC CCA	96
Leu Val Ser Thr Val Met Val Val Phe Trp Glu Tyr Ile Asn Ser Pro	
20 25 30	
GAA GGT TCT TTG TTC TGG ATA TAC CAG TCA AAG ACT CAC AGT TAC CAC	144
Glu Gly Ser Leu Phe Trp Ile Tyr Gln Ser Lys Thr His Ser Tyr His	
35 40 45	

40				
GAA GAA GAA GAC GCT ATA GGC AAC GAA AAG GAA CAA AGA AAA GAA GAC				192
Glu Glu Glu Asp Ala Ile Gly Asn Glu Lys Glu Gln Arg Lys Glu Asp				
50	55	60		
AAC AGA GGA GAG CTT CCA CTA GTG GAC TGG TTT AAT CCT GAG AAA CGC				240
Asn Arg Gly Glu Leu Pro Leu Val Asp Trp Phe Asn Pro Glu Lys Arg				
65	70	75	80	
CCA GAG GTC GTG ACC ATA ACC AGA TGG AAG GCT CCA GTG GTA TGG GAA				288
Pro Glu Val Val Thr Ile Thr Arg Trp Lys Ala Pro Val Val Trp Glu				
85	90	95		
GGC ACT TAC AAC AGA GCC GTC TTA GAT AAT TAT TAT GCC AAA CAG AAA				336
Gly Thr Tyr Asn Arg Ala Val Leu Asp Asn Tyr Tyr Ala Lys Gln Lys				
100	105	110		
ATT ACC GTG GGC TTG ACG GTT CTT GCT GTC GGA AGA TAC ATT GAG CAT				384
Ile Thr Val Gly Leu Thr Val Leu Ala Val Gly Arg Tyr Ile Glu His				
115	120	125		
TAC TTG GAG GAG TTC TTA ATA TCT GCA AAT ACA TAC TTC ATG GTT GGC				432
Tyr Leu Glu Glu Phe Leu Ile Ser Ala Asn Thr Tyr Phe Met Val Gly				
130	135	140		
CAC AAA GTC ATC TTT TAC ATC ATG GTG GAT GAT ATC TCC AGG ATG CCT				480
His Lys Val Ile Phe Tyr Ile Met Val Asp Asp Ile Ser Arg Met Pro				
145	150	155	160	
TTG ATA GAG CTG GGT CCT CTG CGC TCC TTT AAA GTG TTT GAG ATC AAG				528
Leu Ile Glu Leu Gly Pro Leu Arg Ser Phe Lys Val Phe Glu Ile Lys				
165	170	175		
TCC GAG AAG AGG TGG CAA GAC ATC AGC ATG ATG CGC ATG AAG ACC ATC				576
Ser Glu Lys Arg Trp Gln Asp Ile Ser Met Met Arg Met Lys Thr Ile				
180	185	190		
GGG GAG CAC ATC CTG GCC CAC ATC CAG CAC GAG GTG GAC TTC CTC TTC				624
Gly Glu His Ile Leu Ala His Ile Gln His Glu Val Asp Phe Leu Phe				
195	200	205		
TGC ATG GAC GTG GAT CAG GTC TTC CAA AAC AAC TTT GGG GTG GAG ACC				672
Cys Met Asp Val Asp Gln Val Phe Gln Asn Asn Phe Gly Val Glu Thr				
210	215	220		
CTG GGC CAG TCG GTG GCT CAG CTA CAG GCC TGG TGG TAC AAG GCA CAT				720
Leu Gly Gln Ser Val Ala Gln Leu Gln Ala Trp Trp Tyr Lys Ala His				
225	230	235	240	
CCT GAC GAG TTC ACC TAC GAG AGG CGG AAG GAG TCC GCA GCC TAC ATT				768
Pro Asp Glu Phe Thr Tyr Glu Arg Arg Lys Glu Ser Ala Ala Tyr Ile				
245	250	255		
CCG TTT GGC CAG GGG GAT TTT TAT TAC CAC GCA GCC ATT TTT GGG GGA				816
Pro Phe Gly Gln Gly Asp Phe Tyr Tyr His Ala Ala Ile Phe Gly Gly				
260	265	270		

		41		
ACA CCC ACT CAG GTT CTA AAC ATC ACT CAG GAG TGC TTC AAG GGA ATC				864
Thr Pro Thr Gln Val Leu Asn Ile Thr Gln Glu Cys Phe Lys Gly Ile				
275	280		285	
CTC CAG GAC AAG GAA AAT GAC ATA GAA GCC GAG TGG CAT GAT GAA AGC			912	
Leu Gln Asp Lys Glu Asn Asp Ile Glu Ala Glu Trp His Asp Glu Ser				
290	295		300	
CAT CTA AAC AAG TAT TTC CTT CTC AAC AAA CCC ACT AAA ATC TTA TCC			960	
His Leu Asn Lys Tyr Phe Leu Leu Asn Lys Pro Thr Lys Ile Leu Ser				
305	310		315	320
CCA GAA TAC TGC TGG GAT TAT CAT ATA GGC ATG TCT GTG GAT ATT AGG			1008	
Pro Glu Tyr Cys Trp Asp Tyr His Ile Gly Met Ser Val Asp Ile Arg				
325	330		335	
ATT GTC AAG ATA GCT TGG CAG AAA AAA GAG TAT AAT TTG GTT AGA AAT			1056	
Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln Lys Lys Glu Tyr Asn Leu Val Arg Asn				
340	345		350	
AAC ATC TG			1065	
Asn Ile				
355				

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTÉRISTIQUES DE LA SÉQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 354 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Asn	Ser	Lys	Ile	Met	Asn	Val	Lys	Gly	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Met	Leu
1				5						10					15
Leu	Val	Ser	Thr	Val	Met	Val	Val	Phe	Trp	Glu	Tyr	Ile	Asn	Ser	Pro
					20					25				30	
Glu	Gly	Ser	Leu	Phe	Trp	Ile	Tyr	Gln	Ser	Lys	Thr	His	Ser	Tyr	His
						35			40				45		
Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ile	Gly	Asn	Glu	Lys	Glu	Gln	Arg	Lys	Glu	Asp
						50		55			60				,
Asn	Arg	Gly	Glu	Leu	Pro	Leu	Val	Asp	Trp	Phe	Asn	Pro	Glu	Lys	Arg
						65		70			75				80
Pro	Glu	Val	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Trp	Lys	Ala	Pro	Val	Val	Trp	Glu
						85			90					95	
Gly	Thr	Tyr	Asn	Arg	Ala	Val	Leu	Asp	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Lys	Gln	Lys
						100			105				110		

42

Ile Thr Val Gly Leu Thr Val Leu Ala Val Gly Arg Tyr Ile Glu His
 115 120 125

Tyr Leu Glu Glu Phe Leu Ile Ser Ala Asn Thr Tyr Phe Met Val Gly
 130 135 140

His Lys Val Ile Phe Tyr Ile Met Val Asp Asp Ile Ser Arg Met Pro
 145 150 155 160

Leu Ile Glu Leu Gly Pro Leu Arg Ser Phe Lys Val Phe Glu Ile Lys
 165 170 175

Ser Glu Lys Arg Trp Gln Asp Ile Ser Met Met Arg Met Lys Thr Ile
 180 185 190

Gly Glu His Ile Leu Ala His Ile Gln His Glu Val Asp Phe Leu Phe
 195 200 205

Cys Met Asp Val Asp Gln Val Phe Gln Asn Asn Phe Gly Val Glu Thr
 210 215 220

Leu Gly Gln Ser Val Ala Gln Leu Gln Ala Trp Trp Tyr Lys Ala His
 225 230 235 240

Pro Asp Glu Phe Thr Tyr Glu Arg Arg Lys Glu Ser Ala Ala Tyr Ile
 245 250 255

Pro Phe Gly Gln Gly Asp Phe Tyr Tyr His Ala Ala Ile Phe Gly Gly
 260 265 270

Thr Pro Thr Gln Val Leu Asn Ile Thr Gln Glu Cys Phe Lys Gly Ile
 275 280 285

Leu Gln Asp Lys Glu Asn Asp Ile Glu Ala Glu Trp His Asp Glu Ser
 290 295 300

His Leu Asn Lys Tyr Phe Leu Leu Asn Lys Pro Thr Lys Ile Leu Ser
 305 310 315 320

Pro Glu Tyr Cys Trp Asp Tyr His Ile Gly Met Ser Val Asp Ile Arg
 325 330 335

Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln Lys Lys Glu Tyr Asn Leu Val Arg Asn
 340 345 350

Asn Ile

(2) INFORMATION POUR LA SEQ. ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 1029 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

43

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 1..1029

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

AAT TCG AAA ATA ATG AAT GTC AAA GGA AGA GTG GTT CTG TCA ATG CTG	48
Asn Ser Lys Ile Met Asn Val Lys Gly Arg Val Val Leu Ser Met Leu	
1 5 10 15	
CTT GTC TCA ACT GTA ATG GTT GTG TTT TGG GAA TAC ATC AAC AGG ACT	96
Leu Val Ser Thr Val Met Val Val Phe Trp Glu Tyr Ile Asn Arg Thr	
20 25 30	
CAC AGT TAC CAC GAA GAA GAC GCT ATA GGC AAC GAA AAG GAA CAA	144
His Ser Tyr His Glu Glu Glu Asp Ala Ile Gly Asn Glu Lys Glu Gln	
35 40 45	
AGA AAA GAA GAC AAC AGA GGA GAG CTT CCA CTA GTG GAC TGG TTT AAT	192
Arg Lys Glu Asp Asn Arg Gly Glu Leu Pro Leu Val Asp Trp Phe Asn	
50 55 60	
CCT GAG AAA CGC CCA GAG GTC GTG ACC ATA ACC AGA TGG AAG GCT CCA	240
Pro Glu Lys Arg Pro Glu Val Val Thr Ile Thr Arg Trp Lys Ala Pro	
65 70 75 80	
GTG GTA TGG GAA GGC ACT TAC AAC AGA GCC GTC TTA GAT AAT TAT TAT	288
Val Val Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Arg Ala Val Leu Asp Asn Tyr Tyr	
85 90 95	
GCC AAA CAG AAA ATT ACC GTG GGC TTG ACG GTT CTT GCT GTC GGA AGA	336
Ala Lys Gln Lys Ile Thr Val Gly Leu Thr Val Leu Ala Val Gly Arg	
100 105 110	
TAC ATT GAG CAT TAC TTG GAG GAG TTC TTA ATA TCT GCA AAT ACA TAC	384
Tyr Ile Glu His Tyr Leu Glu Phe Leu Ile Ser Ala Asn Thr Tyr	
115 120 125	
TTC ATG GTT GGC CAC AAA GTC ATC TTT TAC ATC ATG GTG GAT GAT ATC	432
Phe Met Val Gly His Lys Val Ile Phe Tyr Ile Met Val Asp Asp Ile	
130 135 140	
TCC AGG ATG CCT TTG ATA GAG CTG GGT CCT CTG CGC TCC TTT AAA GTG	480
Ser Arg Met Pro Leu Ile Glu Leu Gly Pro Leu Arg Ser Phe Lys Val	
145 150 155 160	
TTT GAG ATC AAG TCC GAG AAG AGG TGG CAA GAC ATC AGC ATG ATG CGC	528
Phe Glu Ile Lys Ser Glu Lys Arg Trp Gln Asp Ile Ser Met Met Arg	
165 170 175	
ATG AAG ACC ATC GGG GAG CAC ATC CTG GCC CAC ATC CAG CAC GAG GTG	576
Met Lys Thr Ile Gly Glu His Ile Leu Ala His Ile Gln His Glu Val	
180 185 190	

GAC TTC CTC TTC TGC ATG GAC GTG GAT CAG GTC TTC CAA AAC AAC TTT	624
Asp Phe Leu Phe Cys Met Asp Val Asp Gln Val Phe Gln Asn Asn Phe	
195 200 205	
GGG GTG GAG ACC CTG GGC CAG TCG GTG GCT CAG CTA CAG GCC TGG TGG	672
Gly Val Glu Thr Leu Gly Gln Ser Val Ala Gln Leu Gln Ala Trp Trp	
210 215 220	
TAC AAG GCA CAT CCT GAC GAG TTC ACC TAC GAG AGG CGG AAG GAG TCC	720
Tyr Lys Ala His Pro Asp Glu Phe Thr Tyr Glu Arg Arg Lys Glu Ser	
225 230 235 240	
GCA GCC TAC ATT CCG TTT GGC CAG GGG GAT TTT TAT TAC CAC GCA GCC	768
Ala Ala Tyr Ile Pro Phe Gly Gln Gly Asp Phe Tyr Tyr His Ala Ala	
245 250 255	
ATT TTT GGG GGA ACA CCC ACT CAG GTT CTA AAC ATC ACT CAG GAG TGC	816
Ile Phe Gly Gly Thr Pro Thr Gln Val Leu Asn Ile Thr Gln Glu Cys	
260 265 270	
TTC AAG GGA ATC CTC CAG GAC AAG GAA AAT GAC ATA GAA GCC GAG TGG	864
Phe Lys Gly Ile Leu Gln Asp Lys Glu Asn Asp Ile Glu Ala Glu Trp	
275 280 285	
CAT GAT GAA AGC CAT CTA AAC AAG TAT TTC CTT CTC AAC AAA CCC ACT	912
His Asp Glu Ser His Leu Asn Lys Tyr Phe Leu Leu Asn Lys Pro Thr	
290 295 300	
AAA ATC TTA TCC CCA GAA TAC TGC TGG GAT TAT CAT ATA GGC ATG TCT	960
Lys Ile Leu Ser Pro Glu Tyr Cys Trp Asp Tyr His Ile Gly Met Ser	
305 310 315 320	
GTG GAT ATT AGG ATT GTC AAG ATA GCT TGG CAG AAA AAA GAG TAT AAT	1008
Val Asp Ile Arg Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln Lys Lys Glu Tyr Asn	
325 330 335	
TTG GTT AGA AAT AAC ATC TG	1029
Leu Val Arg Asn Asn Ile	
340	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 342 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Asn Ser Lys Ile Met Asn Val Lys Gly Arg Val Val Leu Ser Met Leu	
1 5 10 15	

45

Leu Val Ser Thr Val Met Val Val Phe Trp Glu Tyr Ile Asn Arg Thr
 20 25 30

His Ser Tyr His Glu Glu Asp Ala Ile Gly Asn Glu Lys Glu Gln
 35 40 45

Arg Lys Glu Asp Asn Arg Gly Glu Leu Pro Leu Val Asp Trp Phe Asn
 50 55 60

Pro Glu Lys Arg Pro Glu Val Val Thr Ile Thr Arg Trp Lys Ala Pro
 65 70 75 80

Val Val Trp Glu Gly Thr Tyr Asn Arg Ala Val Leu Asp Asn Tyr Tyr
 85 90 95

Ala Lys Gln Lys Ile Thr Val Gly Leu Thr Val Leu Ala Val Gly Arg
 100 105 110

Tyr Ile Glu His Tyr Leu Glu Glu Phe Leu Ile Ser Ala Asn Thr Tyr
 115 120 125

Phe Met Val Gly His Lys Val Ile Phe Tyr Ile Met Val Asp Asp Ile
 130 135 140

Ser Arg Met Pro Leu Ile Glu Leu Gly Pro Leu Arg Ser Phe Lys Val
 145 150 155 160

Phe Glu Ile Lys Ser Glu Lys Arg Trp Gln Asp Ile Ser Met Met Arg
 165 170 175

Met Lys Thr Ile Gly Glu His Ile Leu Ala His Ile Gln His Glu Val
 180 185 190

Asp Phe Leu Phe Cys Met Asp Val Asp Gln Val Phe Gln Asn Asn Phe
 195 200 205

Gly Val Glu Thr Leu Gly Gln Ser Val Ala Gln Leu Gln Ala Trp Trp
 210 215 220

Tyr Lys Ala His Pro Asp Glu Phe Thr Tyr Glu Arg Arg Lys Glu Ser
 225 230 235 240

Ala Ala Tyr Ile Pro Phe Gly Gln Gly Asp Phe Tyr Tyr His Ala Ala
 245 250 255

Ile Phe Gly Gly Thr Pro Thr Gln Val Leu Asn Ile Thr Gln Glu Cys
 260 265 270

Phe Lys Gly Ile Leu Gln Asp Lys Glu Asn Asp Ile Glu Ala Glu Trp
 275 280 285

His Asp Glu Ser His Leu Asn Lys Tyr Phe Leu Leu Asn Lys Pro Thr
 290 295 300

Lys Ile Leu Ser Pro Glu Tyr Cys Trp Asp Tyr His Ile Gly Met Ser
 305 310 315 320

46
 Val Asp Ile Arg Ile Val Lys Ile Ala Trp Gln Lys Lys Glu Tyr Asn
 325 330 335

Leu Val Arg Asn Asn Ile
 340

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 708 paires de bases
 (B) TYPE: acide nucléique
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNC pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..708

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	48
1 5 10 15	
TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGC TAT Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	96
20 25 30	
GCT ATG CAT TGG GTG CGC CAG GCC CCC GGA CAA AGG CTT GAG TGG ATG Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met	144
35 40 45	
GGA TGG ATC AAC GCT GGC AAT GGT AAC ACA AAA TAT TCA CAG AAG TTC Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe	192
50 55 60	
CAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC AGG GAC ACA TCC GCG AGC ACA GCC TAC Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr	240
65 70 75 80	
ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAA GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	288
85 90 95	
GCA AGA AGT GGT ATG TTT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTG TCG Ala Arg Ser Gly Met Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	336
100 105 110	
AGA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	384
115 120 125	

47			
TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA			432
Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr			
130	135	140	
GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC			480
Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser			
145	150	155	160
TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT			528
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly			
165	170	175	
AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC AGC			576
Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser			
180	185	190	
TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT			624
Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp			
195	200	205	
GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT GTG			672
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val			
210	215	220	
GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT			708
Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly			
225	230	235	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 236 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe			
50	55	60	
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	

Ala Arg Ser Gly Met Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
 130 135 140
 Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 145 150 155 160
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
 165 170 175
 Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
 180 185 190
 Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp
 195 200 205
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val
 210 215 220
 Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230 235

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 711 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm
- (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMPLACEMENT: 1..711

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GTT TCC GGA TAC ACC CTC ACT GAA TTA	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu	
20 25 30	
TCC ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCT CCT GGA AAA GGG CTT GAG TGG ATG	144
Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	

GGA GGT TTT GAT CCT GAA GAT GGT GAA ACA ATC TAC GCA CAG AAG TTC	192
Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
CAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GAG GAC ACA TCT ACA GAC ACA GCC TAC	240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCA AGA CCT GAG ATT GAT CAG TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTG	336
Ala Arg Pro Glu Ile Asp Gln Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
100 105 110	
TCG AGA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA	384
Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
115 120 125	
TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG	432
Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln	
130 135 140	
ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA	480
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala	
145 150 155 160	
AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT	528
Ser Tryp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr	
165 170 175	
GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC	576
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser	
180 185 190	
AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA	624
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu	
195 200 205	
GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT	672
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His	
210 215 220	
GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT	711
Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
225 230 235	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 237 acides aminés
 - (B) TYPE: acide aminé
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

50

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1															15
5															
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu	Thr	Glu	Leu
															30
20															
Ser	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
															45
35															
Gly	Gly	Phe	Asp	Pro	Glu	Asp	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
															60
50															
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Glu	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
															80
65															
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
															95
85															
Ala	Arg	Pro	Glu	Ile	Asp	Gln	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
															110
100															
Ser	Arg	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
															125
115															
Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln
															140
130															
Thr	Val	Arg	Ile	Thr	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala
															160
145															
Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
															175
165															
Gly	Lys	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
															190
180															
Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu
															205
195															
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	His
															220
210															
Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly			
															235
225															
230															

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 717 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..717

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG GCC	48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACT AGC TAT	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr	
20 25 30	
GCT ATG AAT TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG	144
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
GGA TGG ATC AAC ACC AAC ACT GGG AAC CCA ACG TAT GCC CAG GGC TTC	192
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe	
50 55 60	
ACA GGA CGG TTT GTC TTC TCC TTG GAC ACC TCT GTC AGC ACG GCA TAT	240
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
CTG CAG ATC TGC AGC CTA AAG GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT	288
Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
GCA AGA TCT AAT GAT CCT GCT GAT CAG TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC	336
Ala Arg Ser Asn Asp Pro Ala Asp Gln Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
100 105 110	
ACC GTG TCG AGA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT	384
Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly	
115 120 125	
GGC GGA TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG	432
Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu	
130 135 140	
GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT	480
Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr	
145 150 155 160	
TAT GCA AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC	528
Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val	
165 170 175	

52		
ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT		576
Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
180	185	190
GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG		624
Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln		
195	200	205
GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT		672
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly		
210	215	220
AAC CAT GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT		717
Asn His Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly		
225	230	235

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 239 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
20	25	30	
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Prc Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe			
50	55	60	
Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Ile Cys Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Ser Asn Asp Pro Ala Asp Gln Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
100	105	110	
Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
115	120	125	
Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu			
130	135	140	
Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr			
145	150	155	160

Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
 165 170 175

Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 180 185 190

Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln
 195 200 205

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly
 210 215 220

Asn His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 225 230 235

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 762 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..762

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CGA TTC ATG GAA AGG CAC TGG ATC TTT CTC TTC CAG GTG CAG CTG GTG 48
 Arg Phe Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Gln Val Gln Leu Val
 1 5 10 15

CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC 96
 Gln Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 20 25 30

TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT AGC ATG AAC TGG GTC 144
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val
 35 40 45

CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTT TCA TAC ATT AGT AGT 192
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser
 50 55 60

AGT AGT AGT ACC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC 240
 Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 65 70 75 80

54			
ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser	288		
85 90 95			
CTG AGA GAC GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT ACA AGA GCT TGG AGG Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Ala Trp Arg	336		
100 105 110			
ACG GAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC ACC GTG TCG AGA GGT GGA GGC Thr Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Arg Gly Gly Gly	384		
115 120 125			
GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG TCT GAG CTG ACT Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr	432		
130 135 140			
CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr	480		
145 150 155 160			
TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC CAG CAG Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln	528		
165 170 175			
AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg	576		
180 185 190			
CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr	624		
195 200 205			
GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr	672		
210 215 220			
TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT AAC CAT GTG GTA TTC GGC GGA Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Val Val Phe Gly Gly	720		
225 230 235 240			
GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT AGC GAA AAG GAC GAG CTG Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Glu Lys Asp Glu Leu	762		
245 250			

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 254 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

55

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

Arg	Phe	Met	Glu	Arg	His	Trp	Ile	Phe	Leu	Phe	Gln	Val	Gln	Leu	Val		
1																	
														10	15		
Gln	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser		
														20	25	30	
Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ser	Met	Asn	Trp	Val		
														35	40	45	
Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser		
														50	55	60	
Ser	Ser	Ser	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr		
														65	70	75	80
Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser		
														85	90	95	
Leu	Arg	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Ala	Trp	Arg		
														100	105	110	
Thr	Asp	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Arg	Gly	Gly			
														115	120	125	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr				
														130	135	140	
Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Arg	Ile	Thr		
														145	150	155	160
Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln		
														165	170	175	
Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Gly	Lys	Asn	Asn	Arg		
														180	185	190	
Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr			
														195	200	205	
Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr		
														210	215	220	
Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Gly	Asn	His	Val	Val	Phe	Gly	Gly		
														225	230	235	240
Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Ser	Glu	Lys	Asp	Glu	Leu				
														245	250		

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 687 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONNELLE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..687

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC	48
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
1 5 10 15	
ACT AGC TAT GCT ATG CAT TGG GTG CGC CAG GCC CCC GGA CAA AGG CTT	96
Thr Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu	
20 25 30	
GAG TGG ATG GGA TGG ATC AAC GCT GGC AAT GGT AAC ACA AAA TAT TCA	144
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser	
35 40 45	
CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC ACC ATT ACC AGG GAC ACA TCC GCG AGC	192
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser	
50 55 60	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAA GAC ACG GCC GTG	240
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
65 70 75 80	
TAT TAC TGT GCA AGA AGT GGG GTG TAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC	288
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
85 90 95	
ACC GTG TCG AGA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT	336
Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
100 105 110	
GGC GGA TCG TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG	384
Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu	
115 120 125	
GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT	432
Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr	
130 135 140	
TAT GCA AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA CAG GGC CCT GTA CTT GTC	480
Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val	
145 150 155 160	
ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT	528
Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
165 170 175	

57

GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG ACC ATC ACT GGG GCT CAG	576
Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln	
180	185
190	
GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC AGC AGT GGT	624
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly	
195	200
205	
AAC CAT GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT AGC	672
Asn His Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser	
210	215
220	
GAA AAG GAC GAG CTG	687
Glu Lys Asp Glu Leu	
225	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 229 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
1	5
10	15
Thr Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu	
20	25
30	
Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser	
35	40
45	
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser	
50	55
60	
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
65	70
75	80
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
85	90
95	
Thr Val Ser Arg Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
100	105
110	
Gly Gly Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu	
115	120
125	
Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr	
130	135
140	

58

Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val
145 150 155 160

Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
165 170 175

Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln
180 185 190

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly
195 200 205

Asn His Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser
210 215 220

Glu Lys Asp Glu Leu
225

H

REVENDICATIONS

5 1. Utilisation de séquences nucléotidiques codant pour des anticorps dirigés contre toute molécule impliquée dans un phénomène de rejet de greffe (encore désignés ci-après anticorps anti-molécules), et notamment contre toute molécule possédant une activité telle que ladite molécule représente un épitope xénoantigénique, ou participe à la biosynthèse d'épitopes xénoantigéniques dans des cellules de mammifères non humains (et plus particulièrement à la surface de ces cellules), ces épitopes étant susceptibles d'être reconnus par des xénoanticorps naturels humains lorsque lesdites cellules, ou organes constitués de ces cellules, de mammifères non humains, sont greffés chez l'homme, pour la préparation de cellules transgéniques, ou organes transgéniques, de mammifères non humains, au sein desquels lesdites molécules forment en totalité ou en partie des complexes immuns avec lesdits anticorps anti-molécules, de telle sorte que l'activité desdites molécules dans les phénomènes de rejet de greffe soit totalement ou partiellement inhibée, en particulier que les xénoanticorps susmentionnés ne reconnaissent plus, en totalité ou en partie, lesdits épitopes, ou au sein desquels la biosynthèse desdits épitopes xénoantigéniques est partiellement ou totalement inhibée, lesdites cellules ou lesdits organes transgéniques de mammifères non humains étant destinés à être greffés chez un patient.

10 2. Utilisation selon la revendication 1, de séquences nucléotidiques codant pour des anticorps dirigés contre :

15 - tout épitope xénoantigénique, glucidique ou non glucidique, reconnu par des xénoanticorps humains, et plus particulièrement les épitopes glucidiques galactosylés situés à la surface des membranes de cellules de mammifères non humains, notamment l'épitope α -galactosyl présent à la surface de cellules de porc et constitué de l'ensemble Gal α 1,3Gal-N-acétyllactosamine susmentionné,

20 - toute molécule participant à la biosynthèse d'épitopes xénoantigéniques chez l'homme, de nature glucidique ou non glucidique, et plus particulièrement les galactosyltransférases présentes dans les cellules de mammifères non humains, notamment l'enzyme α 1,3GT présente dans les cellules de porc,

25 - toute molécule à caractère inflammatoire synthétisée dans l'endothélium de mammifères non humains, et dont l'activité biologique conduit notamment à la modification des propriétés anticoagulantes de l'endothélium *in vivo* en milieu xénogénique, telle que les cytokines et chemoattracteurs (IL-1, IL-6, IL-8, IP-

10, RANTES, MCP/JE, inhibiteurs p15E, GM-CSF, G-CSF), les molécules d'adhésion (ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1, c-sis, GPIb α , vWF, ligand LAM-1) les facteurs de transcription ou modifiant la transcription (c-fos, NFkB, Gem), les régulateurs du tonus vasculaire (iNO synthase, PGH synthase, endothéline), les facteurs intervenant dans la coagulation (PAF acétyltransférase, facteur tissulaire, PAI-1), les facteurs d'immunocompétence (CMH I, CMH II),

5 - les récepteurs membranaires à des molécules présentes chez le receveur, l'action de ces molécules étant dirigée vers un rejet de greffe, dont par exemple le C5aR, ou le TNF α R, ou les récepteurs aux cellules NK.

10

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, de séquences nucléotidiques codant pour des anticorps dirigés contre l'une au moins des isoformes (et avantageusement contre toutes les isoformes) des galactosyl transférases présentes chez les mammifères non humains, et plus particulièrement de l'enzyme α -1,3GT présente chez le porc, pour la préparation d'organes de mammifères non humains transgéniques au sein desquels la biosynthèse des épitopes α -galactosyl dans les cellules desdits organes est partiellement ou totalement inhibée.

20

4. Anticorps, le cas échéant simple brin, dirigés contre l'une au moins des isoformes de l' α -1,3GT, et plus particulièrement dirigés contre l'une au moins des isoformes de l' α -1,3GT présentes chez le porc et représentées par les séquences en acides aminés SEQ ID NO 2 (correspondant à l'isoforme 1), SEQ ID NO 4 (correspondant à l'isoforme 2), SEQ ID NO 6 (correspondant à l'isoforme 3) et SEQ ID NO 8 (correspondant à l'isoforme 4), ces isoformes 1 à 4 étant respectivement codées par les séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 7, ou codées par toutes séquences nucléotidiques dérivées de ces dernières, notamment par dégénérescence du code génétique.

25

5. Anticorps selon la revendication 4, dirigés contre l'une au moins des isoformes 3 et 4 de l' α -1,3GT présentes chez le porc et représentées par les séquences en acides aminés SEQ ID NO 6 et SEQ ID NO 8.

30

6. Anticorps selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisés en ce qu'ils sont représentés par les séquences en acides aminés SEQ ID NO 10 (anticorps désigné ScFv1), SEQ ID NO 12 (anticorps désigné ScFv2), SEQ ID NO 14 (anticorps désigné ScFv3), SEQ ID NO 16 (anticorps désigné ScFv4) et SEQ

5 ID NO 18 (ScFv5), ou par toute séquence en acides aminés dérivée de ces dernières, notamment par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés, ou par tout fragment des séquences susmentionnées ou de leurs séquences dérivées, lesdites séquences et lesdits fragments étant susceptibles de reconnaître l'une au moins des isoformes de l' α -1,3GT.

10 7. Séquences nucléotidiques codant pour un anticorps selon l'une des revendications 4 à 6, et comportant notamment les séquences nucléotidiques représentées par SEQ ID NO 9 (codant pour ScFv1), SEQ ID NO 11 (codant pour ScFv2), SEQ ID NO 13 (codant pour ScFv3), SEQ ID NO 15 (codant pour ScFv4), SEQ ID NO 17 (codant pour ScFv5), ou toute séquence nucléotidique dérivée de ces dernières, notamment les séquences dérivées par dégénérescence du code génétique, et étant néanmoins capables de coder pour les anticorps ScFv1, ScFv2, ScFv3, ScFv4 ou ScFv5, ou les séquences dérivées par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, ou tout fragment des séquences nucléotidiques susmentionnées ou de leurs séquences dérivées, lesdites séquences dérivées et lesdits fragments étant susceptibles de coder pour un anticorps susceptible de reconnaître l'une au moins des isoformes de l' α 1,3GT.

15 20 8. Vecteur contenant l'une au moins des séquences nucléotidiques selon la revendication 7 et les éléments nécessaires à l'expression des anticorps selon l'une des revendications 4 à 6.

25 9. Hôte cellulaire contenant l'un au moins des vecteurs selon la revendication 8.

30 35 10. Mammifère transgénique non humain, ou cellules de mammifères, comprenant dans son génome au moins une séquence nucléotidique codant pour des anticorps dirigés contre toute molécule impliquée dans un phénomène de rejet de greffe (encore désignés ci-après anticorps anti-molécules), et notamment contre toute molécule possédant une activité telle que ladite molécule représente un épitope xénoantigénique, ou participe à la biosynthèse d'épitopes xénoantigéniques dans des cellules de mammifères non humains (et plus particulièrement à la surface de ces cellules), ces épitopes étant susceptibles d'être reconnus par des xénoanticorps naturels humains lorsque lesdites cellules, ou organes constitués de ces cellules, de mammifères non humains, sont greffés chez l'homme, et plus particulièrement au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 7.

11. Mammifère transgénique non humain selon la revendication 10, tel qu'obtenu par introduction, notamment par microinjection, dans un ovocyte fécondé, d'au moins une séquence nucléotidique codant pour des anticorps dirigés contre toute molécule impliquée dans un phénomène de rejet de greffe, et plus particulièrement de l'une des séquences nucléotidiques selon la revendication 7, et insertion de l'embryon dans la matrice d'une mère de substitution et développement de l'embryon à terme.

10 12. Cellules cultivées à partir des animaux transgéniques non humains selon la revendication 10 ou la revendication 11.

15 13. Organes de mammifères non humains, comprenant dans le génome des cellules les constituant au moins une séquence nucléotidique codant pour des anticorps dirigés contre toute molécule impliquée dans un phénomène de rejet de greffe (encore désignés ci-après anticorps anti-molécules), et notamment contre toute molécule possédant une activité telle que ladite molécule représente un épitope xénoantigénique, ou participe à la biosynthèse d'épitopes xénoantigéniques dans des cellules de mammifères non humains (et plus particulièrement à la surface de ces cellules), ces épitopes étant susceptibles d'être reconnus par des xénoanticorps naturels humains lorsque lesdites cellules, ou organes constitués de ces cellules, de mammifères non humains, sont greffés chez l'homme, et plus particulièrement au moins une des séquences nucléotidiques selon la revendication 7, tels qu'obtenus par prélèvement sur des mammifères transgéniques non humains selon la revendication 10 ou la revendication 11.

20 25 14. Polypeptide comprenant la séquence d'acides aminés telle que représentée par la SEQ ID NO 6 (correspondant à l'isoforme 3 de l' α 1,3-GT) ou SEQ ID NO 8 (correspondant à l'isoforme 4 de l' α 1,3-GT), ou tout polypeptide contenant tout fragment d'au moins environ 6 acides aminés, de l'une des susdites séquences d'acides aminés, ledit polypeptide contenant ce fragment étant susceptible de générer des anticorps reconnaissant l'une au moins des quatre isoformes de l' α -1,3GT, ou toute séquence dérivée de ces dernières, notamment par addition, suppression ou modification d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que la séquence dérivée soit susceptible de générer des anticorps reconnaissant l'une au moins des quatre susdites isoformes.

30 35

15. Séquences nucléotidiques comprenant les séquences représentées par SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 7, ou toutes séquences dérivées, notamment par les séquences dérivées par dégénérescence du code génétique, et étant néanmoins capables de coder pour les polypeptides représentés par les séquences en acides aminés représentées par SEQ ID NO 6 et SEQ ID NO 8 respectivement, ou les séquences dérivées par addition, suppression ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides, ou tout fragment des séquences nucléotidiques susmentionnées ou de leurs séquences dérivées, lesdites séquences dérivées et lesdits fragments étant susceptibles de coder puis un anticorps susceptible de reconnaître l'un au moins des isoformes de l' α 1,3 GT.

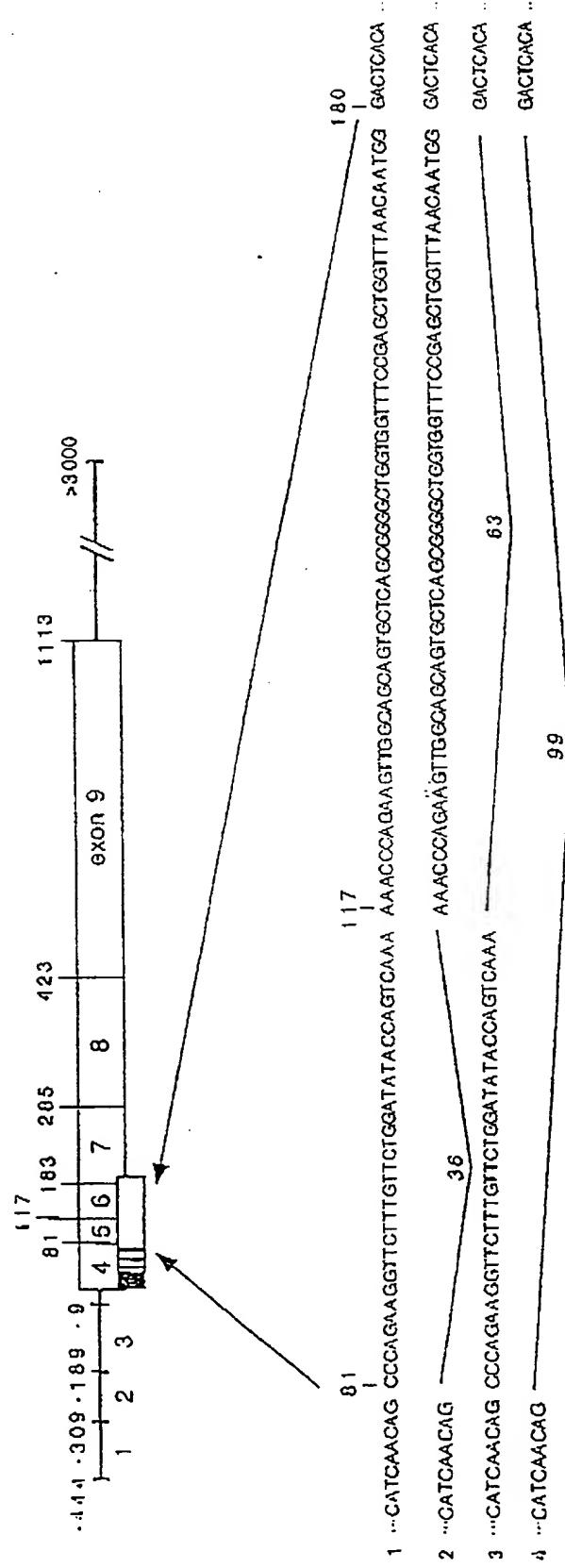
Figure 1

Figure 2

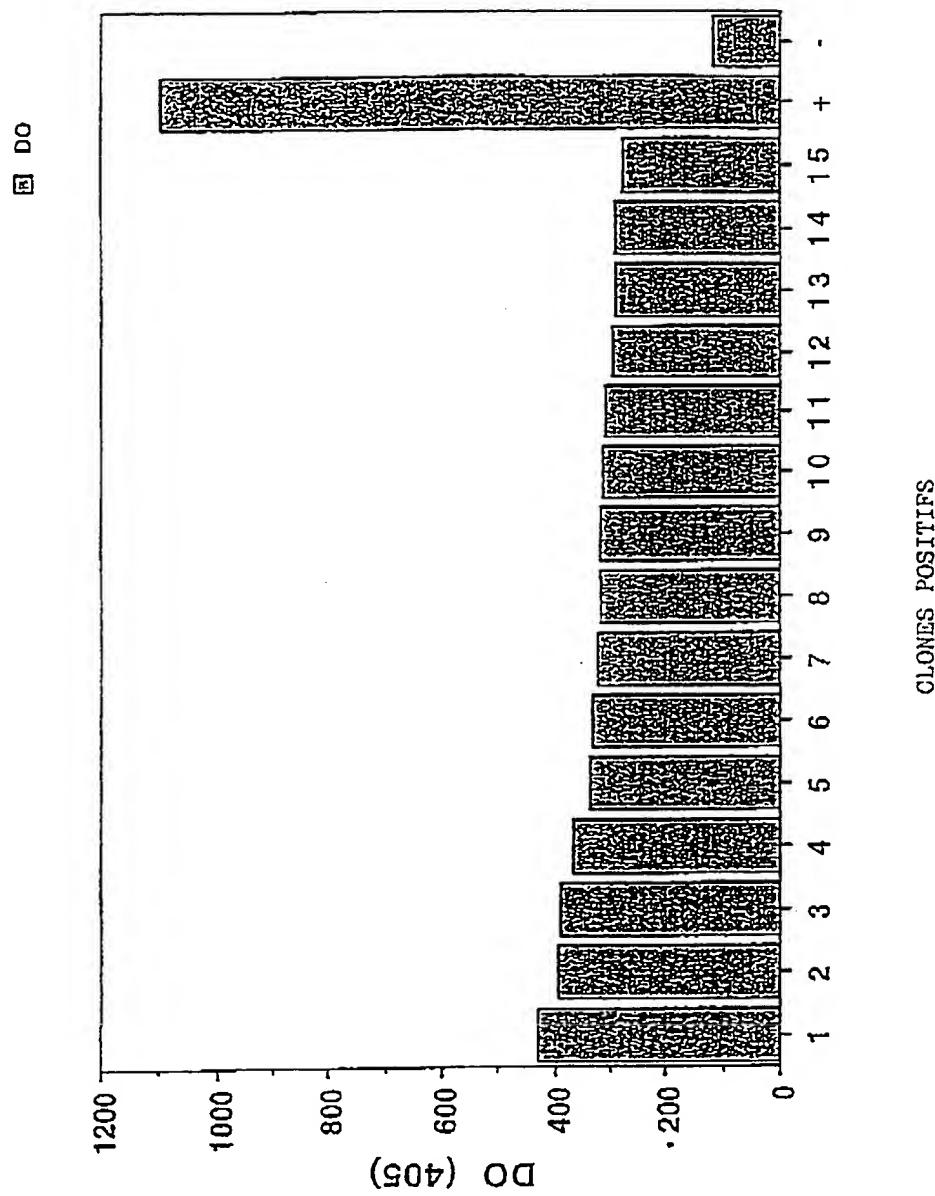


Figure 3

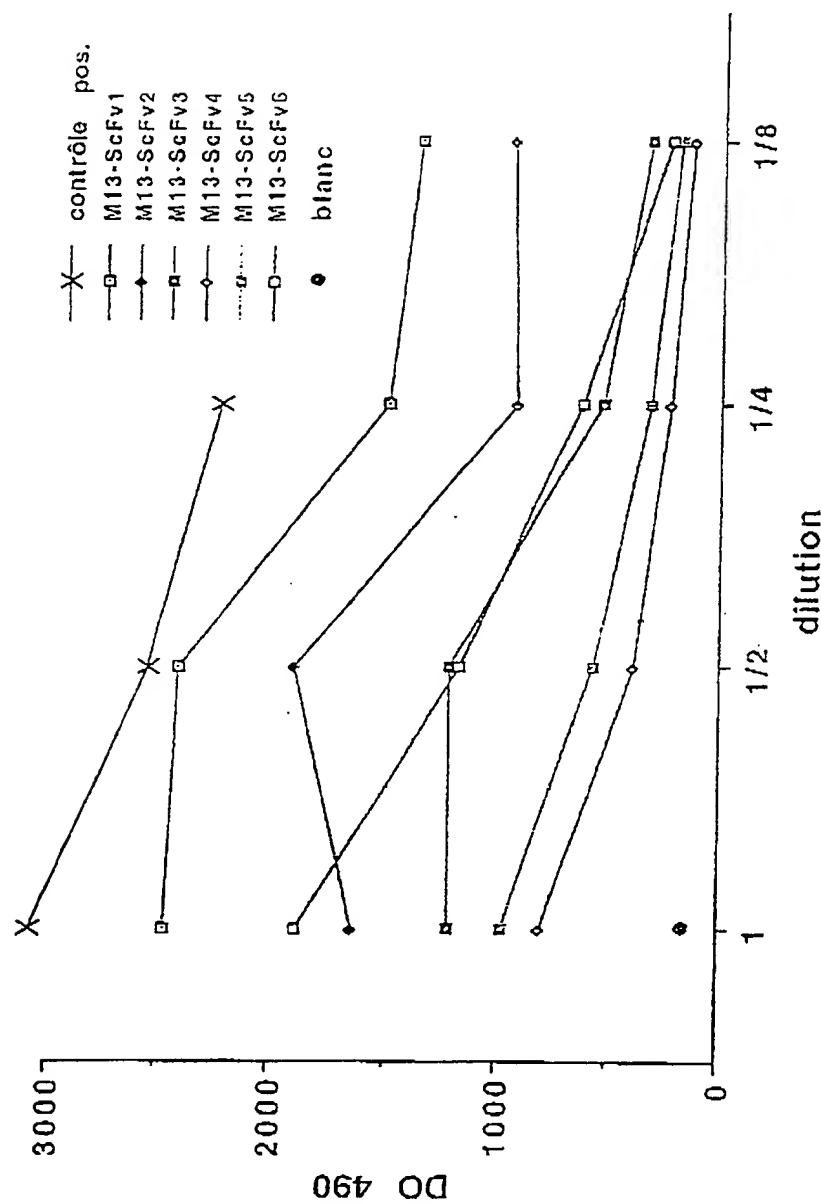


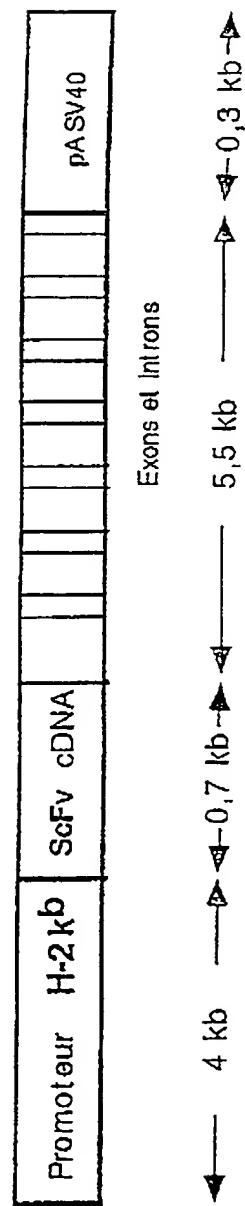
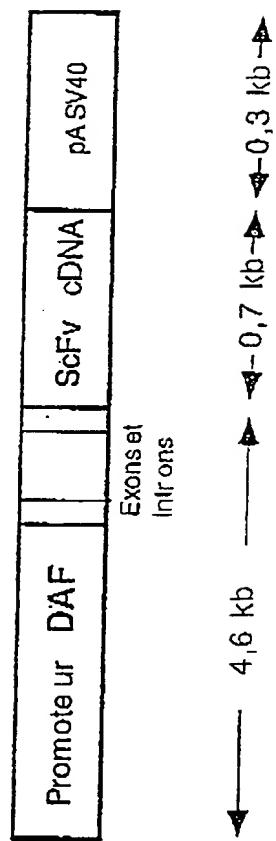
Figure 4

Figure 5



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 95 33828 A (DIACRIN, INC.) 14 Décembre 1995 * page 12, ligne 13 - ligne 32 * * page 16, ligne 24 - page 18, ligne 4 * * page 26, ligne 6 - page 27, ligne 8 * * revendications 19-21,29,31 * ---	1,2
D, X	IMMUNOGENETICS, vol. 41, no. 2/3, 1995, BERLIN, ALLEMAGNE, pages 101-105, XP000670235 K. STRAHAN ET AL.: "cDNA sequence and chromosome localization of pig alpha1,3 galactosyltransferase." * figure 1 * ---	14,15
Y	WO 94 25586 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 10 Novembre 1994 * le document en entier * ---	1-3
Y	EP 0 378 188 A (KONICA CORPORATION) 18 Juillet 1990 * le document en entier * ---	1-3
A	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 222, no. 3, 1991, LONDRES, GRANDE BRETAGNE, pages 581-597, XP000670314 J. MARKS ET AL.: "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." * tableaux 3,4 * ---	4-9
A	WO 95 24495 A (ABBOTT LABORATORIES) 14 Septembre 1995 * exemples * * revendications * ---	1-15
1	Date d'achèvement de la recherche 16 Avril 1997	Examinateur Nooij, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulcation non-écrite P : document intercalaire		

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 90, no. 23, 1 Décembre 1993, WASHINGTON, DC, ÉTATS-UNIS, pages 11391-11395, XP000561954 M. SANDRIN ET AL.: "Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha1,3)Gal epitopes." * page 11395, colonne de gauche, ligne 46 - ligne 55 * * figure 3A * ---	14, 15
A	WO 95 20661 A (BRESATEC LTD. ET AL.) 3 Août 1995 * exemples * * revendications * ---	1-15
A	WO 94 21799 A (AUSTIN RESEARCH INSTITUTE) 29 Septembre 1994 * exemple 7 * * revendications 9,10 * ---	1-15
A	TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, vol. 28, no. 2, Avril 1996, NEW YORK, NY, ÉTATS-UNIS, page 758 XP000644542 K. MCCURRY ET AL.: "Human complement regulatory proteins expressed in transgenic swine protect swine xenografts from humoral injury." * le document en entier * -----	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
1		
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
16 Avril 1997		Nooij, F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

